

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. F. HOFSTÄDTER
KLINIKUM
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE NUKLEÄRE EXPRESSION VON KARYOPHERIN α_2 :
EIN PRÄDIKTIVER FAKTOR FÜR DAS ÜBERLEBEN
VON PATIENTINNEN MIT FORTGESCHRITTENEM MAMMAKARZINOM
UNABHÄNGIG VON DER THERAPIEINTENSITÄT**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Robert Paul Meiler
aus Weiden

2010

Dekan:

Prof. Dr. B. Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. A. Hartmann

2. Berichterstatter:

PD Dr. G. Brockhoff

Tag der mündlichen Prüfung:

13. September 2010

Für meine Eltern und Geschwister

1	Einleitung	6
1.1	<i>Epidemiologie des Mammakarzinoms</i>	<i>6</i>
1.2	<i>Normale Anatomie der Brust und Pathomorphologie des Mammakarzinoms</i>	<i>8</i>
1.2.1	<u>Histologische Klassifikation.....</u>	9
1.2.2	<u>Histologisches Grading</u>	10
1.2.3	<u>Pathologisches Staging: pTNM-Klassifikation</u>	11
1.2.4	<u>Prognostischer Effekt des axillären Lymphknotenbefalls.....</u>	12
1.3	<i>Molekulare Pathogenese</i>	<i>14</i>
1.3.1	<u>Überblick über die molekulare und zelluläre Biologie beim Mammakarzinom.....</u>	14
1.3.2	<u>Onkogen HER-2/neu</u>	15
1.3.3	<u>Tumorsuppressorgen (TSG) p53</u>	16
1.3.4	<u>Karyopherin</u>	18
1.3.5	<u>Genetische Instabilität</u>	20
1.3.5.1	<u>Mikrosatelliteninstabilität (MSI)</u>	20
1.3.5.2	<u>Loss of heterozygosity (LOH)</u>	23
1.3.5.3	<u>Hereditäres Mammakarzinom</u>	23
1.4	<i>Hochdosis-Chemotherapie (HDCT) mit autologer Stammzelltransplantation (ASZT).....</i>	<i>25</i>
1.4.1	<u>Adjuvante Therapie bei Hochrisikopatientinnen.....</u>	26
1.4.2	<u>Metastasiertes Mammakarzinom.....</u>	28
2	Material.....	32
2.1	<i>Laborgeräte.....</i>	<i>32</i>
2.2	<i>Chemikalien, Enzyme und Antikörper.....</i>	<i>33</i>
2.3	<i>Puffer und Lösungen.....</i>	<i>33</i>
2.3.1	<u>Allgemeine Lösungen</u>	33
2.3.2	<u>Lösungen für die HE-Färbung von Paraffinschnitten.....</u>	34
2.3.3	<u>Lösungen zur Methylenblau-Färbung von Paraffinschnitten</u>	34
2.3.4	<u>Lösungen für die DNA-Isolation aus Paraffinmaterial.....</u>	34
2.3.5	<u>Lösungen für die Amplifikation genomischer DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion</u>	34
2.3.6	<u>Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.....</u>	35
2.3.7	<u>Lösungen für die Fällung und Reinigung von DNA zur Sequenzierung.....</u>	35
2.3.8	<u>Ansätze für die Sequenzreaktion.....</u>	36
2.3.9	<u>Lösungen für das Sequenzieren am Gerät 310</u>	36
2.3.10	<u>Lösungen für die Anti-Goat Detektion.....</u>	36
2.4	<i>Verwendete Primer</i>	<i>37</i>
2.4.1	<u>Primer: Mikrosatellitenanalyse.....</u>	37
2.4.2	<u>Primer: p53-Sequenzierung</u>	38
3	Methoden.....	40
3.1	<i>DNA- Isolierung aus Paraffinmaterial.....</i>	<i>40</i>
3.1.1	<u>Anfertigung von Paraffinschnitten</u>	40
3.1.2	<u>Entparaffinieren der Gewebeschnitte</u>	40
3.1.3	<u>Anfertigung eines HE-Schnittpräparates</u>	40
3.1.4	<u>Mikrodissektion.....</u>	41
3.1.5	<u>Proteinase-K-Verdau und Isolierung der DNA</u>	41
3.2	<i>Techniken für die Mikrosatelliten- Analyse (MA) und die LOH-Analyse</i>	<i>43</i>
3.2.1	<u>In-vitro-DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</u>	43
3.2.2	<u>Anwendung der PCR für die LOH-und MSI-Analyse</u>	44
3.2.3	<u>Fragmentanalyse (FA).....</u>	46
3.2.4	<u>Interpretation der Bandenmuster</u>	46
3.3	<i>Sequenzierung des p53-Gens</i>	<i>48</i>
3.3.1	<u>Sequenzreaktion nach Sanger.....</u>	48

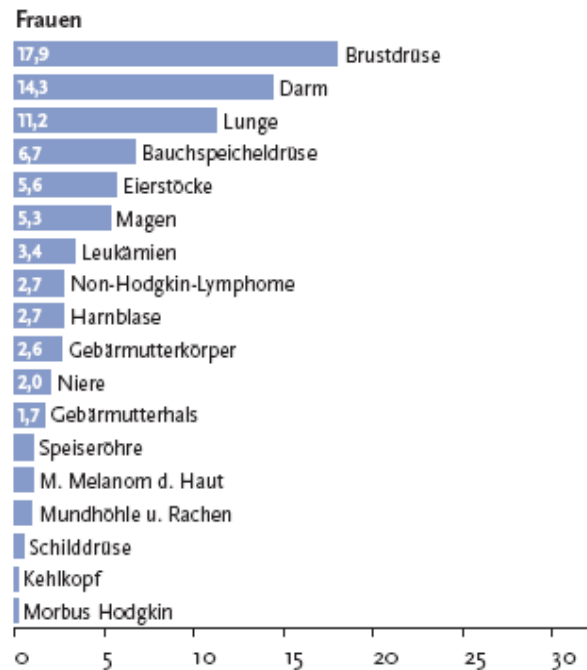
3.3.2	<u>Amplifikation der DNA durch Nested-PCR</u>	49
3.3.3	<u>PEG- Fällung der PCR-Produkte</u>	49
3.3.4	<u>Abschätzung der DNA-Konzentration durch Agarosegel-Elektrophorese (1,25%)</u>	50
3.3.5	<u>Sequenzreaktion</u>	51
3.3.6	<u>Ethanolfärbung der Reaktionsprodukte</u>	51
3.3.7	<u>Elektrophorese und Detektion der Fluoreszenzsignale</u>	52
3.3.8	<u>Auswertung der Daten</u>	52
3.4	<i>Immunhistochemische Färbung zur KPNA2-Analyse: Anti-Goat Detektion (Sigma)</i>	53
3.4.1	<u>Entparaffinieren der Gewebeschnitte</u>	53
3.4.2	<u>Schnellkochtopf (SKT)-Vorbehandlung</u>	53
3.4.3	<u>Inkubation der Antikörper</u>	53
3.4.4	<u>Hämatoxylin-Färbung der Gewebeschnitte</u>	53
3.4.5	<u>Auswertung</u>	54
3.5	<i>Statistische Auswertung der Daten</i>	54
4	Ergebnisse	55
4.1	<i>Methodische Erfahrungen</i>	55
4.2	<i>Charakteristik des Patientenkollektivs</i>	56
4.3	<i>Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und chromosomale Instabilität (CIN) beim Mammakarzinom</i>	59
4.4	<i>p53: Immunhistochemie und Sequenzierung</i>	60
4.4.1	<u>Sequenzierung</u>	60
4.4.2	<u>Immunhistochemie</u>	61
4.5	<i>KPNA2- Immunhistochemie</i>	63
5	Diskussion	70
5.1	<i>Spezifische genetische Analyse durch Mikrodissektion</i>	70
5.2	<i>Prognosefaktoren beim Mammakarzinom</i>	71
5.2.1	<u>Etablierte Prognosefaktoren</u>	73
5.2.2	<u>Molekulare Prognosefaktoren</u>	74
5.2.2.1	Her-2/neu	74
5.2.2.2	Mikrosatelliteninstabilität (MSI)	75
5.2.2.3	Tumorsuppressorgen p53	80
5.2.2.4	Karyopherin (KPNA2)	85
5.3	<i>Perspektiven für die Onkologie</i>	90
6	Zusammenfassung	92
7	Anhang	95
7.1	<i>Literaturverzeichnis</i>	95
7.2	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	105
7.3	<i>Danksagung</i>	108
7.4	<i>Lebenslauf</i>	109
7.5	<i>Originalarbeiten</i>	110

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Jährlich erkranken über 57.000 Frauen in Deutschland an Brustkrebs. Das Mammakarzinom ist mit 17,9% aller Krebssterbefälle die häufigste maligne Tumorerkrankung bei Frauen.

Abb. 1.1: Prozentualer Anteil an der Zahl der Krebssterbefälle in Deutschland 2004 (Frauen n= 98.079)



Mehr als ein Viertel (27,8%) aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen betrifft die Brust. Anders ausgedrückt besteht für jede Frau ein 10%iges Risiko im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken. Brustkrebs ist zunehmend mit jüngerem Alter assoziiert. So ist er bei ca. 40% der Neuerkrankungen bei Frauen unter 60 Jahren die Diagnose und mit einem mittleren Erkrankungsalter von 63 Jahren – 6 Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter bei Krebs gesamt [GEKID2008].

Das Brustkrebsrisiko steigt bereits ab dem 40. Lebensjahr mit zunehmendem Alter

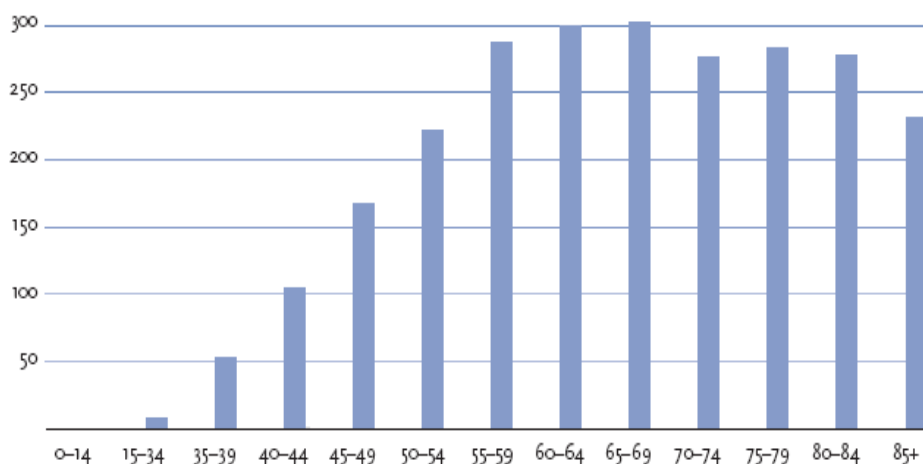


Abb. 1.2: Schätzung der altersspezifischen Inzidenz in Deutschland 2004
Neuerkrankungen pro 100.000 in Altersgruppen

beträchtlich an.

Abbildung 1.3 zeigt deutlich, dass die Inzidenz des Mammakarzinoms in den Industrieländern weitaus höher ist als in den Schwellenländern, sowie den Ländern der Dritten Welt.

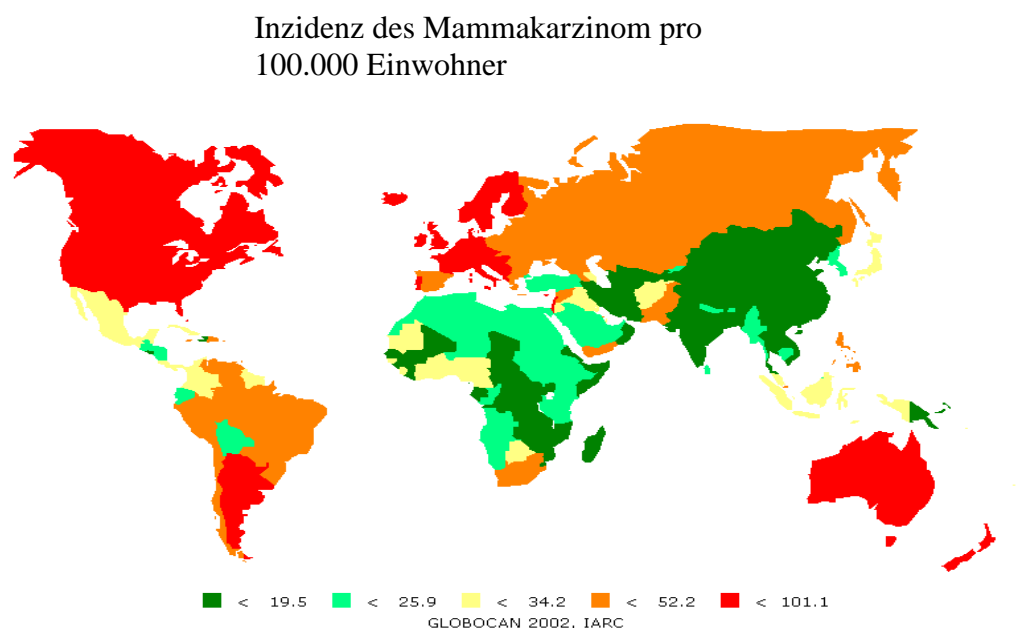


Abb. 1.3: Weltweite Inzidenz des Mammakarzinoms, (<http://www-dep.iarc.fr/GLOBOCAN/map.asp?cancer=132&rate=1&sex=2&type=1&submit=Execute&size=2&colour=1&output=1&scale=1>, 01.09.08)

Die Disparitäten bzgl. der regionalen Häufung die Neuerkrankungsrate geben einen Anhalt für die Risikofaktoren, die zur Entstehung des Mammakarzinoms beitragen.

Tab. 1.1: Risikofaktoren des Mammakarzinoms [aus von Minckwitz, 2004]

Risikofaktor	Risikoerhöhung	Relatives Risiko
Alter	70% > 50 Jahre	2,0
Geschlecht	99,4 % Frauen, 0,6% Männer	
Sozioökonomische Faktoren	Höherer sozioökonomischer Status	1,5-2,0
Genetik	BRCA 1-Mutationen (0,5 % der weibl. Bevölkerung)	7,0
	Mutter mit Mammakarzinom < 40 Jahre	2,1
	Mutter mit Mammakarzinom 40-70 Jahre	1,5
	Schwester mit Mammakarzinom	2,3
	Schwester und Mutter mit Mammakarzinom	2,5
	Männer mit weibl. Verwandten 1. Grades mit Mammakarzinom	1,8
Ernährung	Fetteiche Nahrung	1,12
	Alkoholkonsum > 24 g/d	1,4 -1,7
Anthropometrie	Deutliches Übergewicht	2,0
	Höheres Körpergewicht/Stammfett	(?)
Reproduktive Faktoren	Frühe Menarche (< 12 Jahren)	2,0
	Späte Menopause (> 50 verglichen mit < 45 Jahren)	2,0
	Frühe ausgetragene Schwangerschaft (< 20 Jahren)	0,3
	Späte erste Schwangerschaft (> 35 Jahren)	1,5
Endogene Hormone	Prolaktin im Serum erhöht	(?)

Exogene Faktoren	Progesteron im Serum erhöht	(?)
	Östrogen im Serum/Urin erhöht	(?)
	Orale Kontrazeptiva	1,1
	Hormonsubstitution	1,7-2,2
Bestrahlung	Radiotherapie in Kindheit und Pubertät	4,0
Benigne Brusterkrankungen	Proliferierende Mastopathie mit Atypien	4,0-8,0
	Lobuläres Karzinom in situ	6,9
Malignom in der	Ovarialkarzinom	2,0-3,0
Eigenanamnese	Endometriumkarzinom	1,3-2,0
Mammakarzinom in der	Duktales Karzinom in situ	4,0-5,0
	Kontralateral bekanntes Mammakarzinom	5,0-10,0

1.2 Normale Anatomie der Brust und Pathomorphologie des Mammakarzinoms

Bei der erwachsenen Frau besteht die normale Brust aus einem epithelialen Anteil, den Drüsenlappen (Lobuli), und einem Stroma-Anteil, dem Fettgewebe. Die epithelialen Elemente bestehen aus tubuloalveolären Drüsen. Über Milchgänge (Ductus) werden die Lobuli in Richtung auf die Brustwarze miteinander verbunden. Den anatomischen Aufbau zeigt Abbildung 1.4:

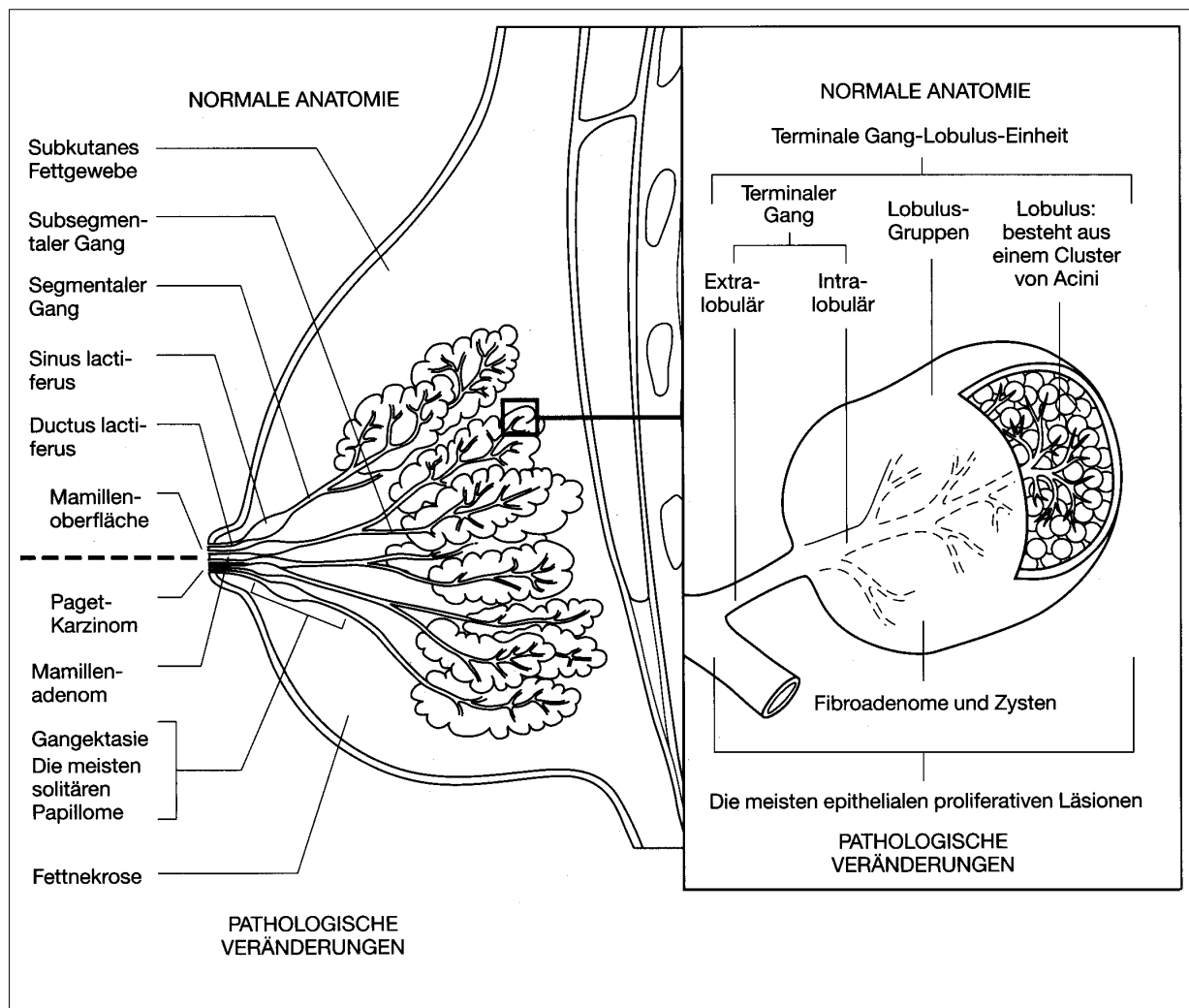


Abb 1.4: Anatomie der Brust sowie Stellen patholog. Veränderungen (nach Hayes, 1991)[aus Eberlein et al. 1995]

1.2.1 Histologische Klassifikation

Die malignen Brustveränderungen betreffen zu über 95% die epithelialen Anteile der Brust und werden daher als Adenokarzinome bezeichnet. Mammakarzinome können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: das **nicht invasive Carcinoma in situ (CIS)** – Tumorzellen auf Gänge oder Lobuli beschränkt ohne Invasion des umgebenden Stromas – und das **invasive (infiltrierende) Karzinom** – mit Invasion des Stromas. Das CIS wird weiterhin in das **duktale Karzinom** (oder auch intraduktales Karzinom) und das **lobuläre Karzinom** unterschieden. Eine Einteilung der Karzinomformen der Brustdrüse wurde durch die WHO erstellt.

Tab. 1.2: WHO-Klassifikation der nicht-invasiven und invasiven Mammakarzinome (2005)

Nicht-invasive Karzinome
Duktales Carcinoma in situ (DCIS)
Carcinoma lobulare in situ (CLIS)
Invasive Karzinome
Invasives duktales Mamma-CA
Invasives duktales Mamma-CA mit intraduktales Komponente
Invasives lobuläres Mamma-CA
Muzinöses Mamma-CA
Medulläres Mamma-CA
Papilläres Mamma-CA
Tubuläres Mamma-CA
Adenoid-zystisches Mamma-CA
Sekretorisches Mamma-CA
Apokrines Mamma-CA
Mamma-CA mit Metaplasie
Anderes Mamma-CA
M. Paget der Mamille

Der häufigste Typ der invasiven Mammakarzinome stellt das duktales Karzinom (auch „unspezifisches infiltrierendes Karzinom“) dar. Es handelt sich um harte, graue, grobkörnige Raumforderungen. Mikroskopisch werden diese anhand von Struktur und Zytologie in drei Grade unterteilt: gut differenziert (Grad I), mäßig differenziert (Grad II) und schlecht differenziert (Grad III).

Als zweithäufigste Art treten die eher beidseitigen und multizentrisch infiltrierenden lobulären Karzinome auf. Die invasiven Tumore der Brust metastasieren häufig lymphogen und hämatogen in Lunge, Leber und Knochen. An weiteren Karzinomformen wären u.a. das medulläre, das tubuläre oder das muzinöse Karzinom zu nennen, deren Prognose meist günstiger ist.

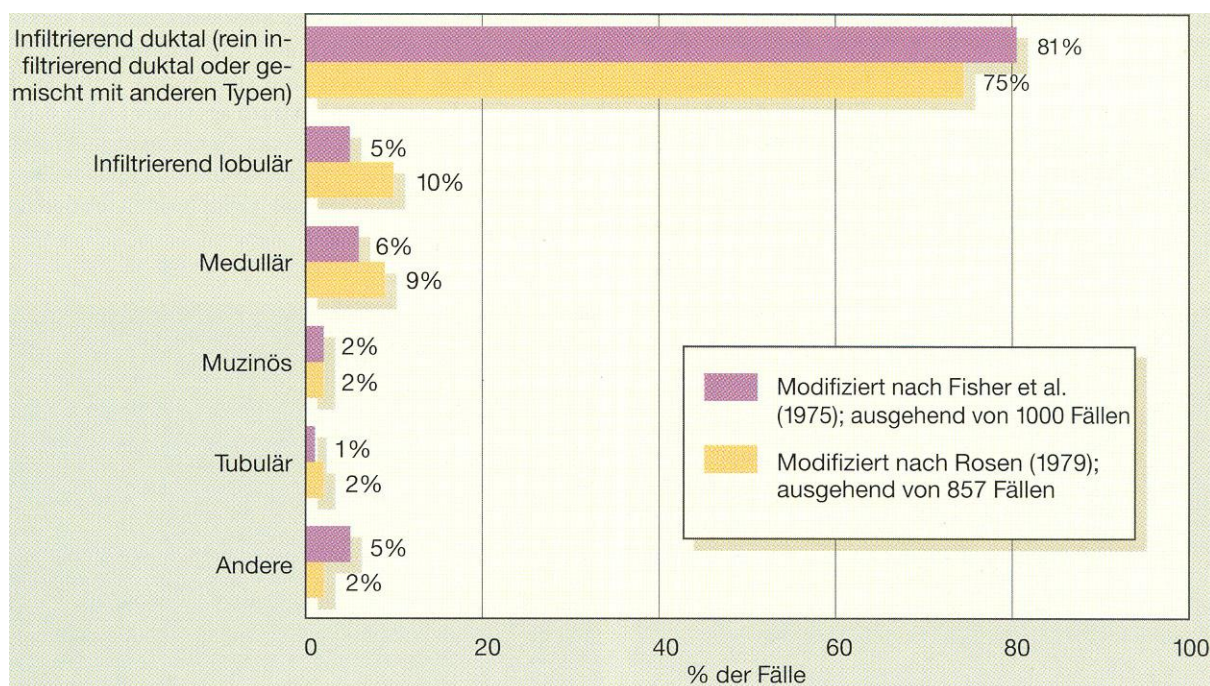


Abb. 1.5: Häufigkeiten der verschiedenen Mammakarzinome anhand zweier großer Studien

1.2.2 Histologisches Grading

Die Differenzierungseinstufung (Grading) zur Einteilung des Malignitätsgrades der verschiedenen invasiven Mammakarzinome wird nach Bloom und Richardson anhand tubulärer Strukturen, der Kernpolymorphie und der Mitoserate vorgenommen.

Tab. 1.3: Kriterien des Gratings für das Mammakarzinom [Bloom and Richardson, modifiziert nach Bässler et al., 1992]

Merkmale	Kriterien	Scorewert
Tubulusausbildung	> 75%	1
	10-75%	2
	< 10%	3
Kernpolymorphie	Gering	1
	Mittelgradig	2
	Stark	3
Mitoserate*	0-5 / 10 HPF	1
	6-11 / 10 HPF	2
	≥ 12 / 10 HPF	3

Summenscore	Malignitätsgrad	G-Gruppe	Definition
3, 4, 5	Gering	G1	Gut differenziert
6, 7	Mäßig	G2	Mäßig differenziert
8, 9	Hoch	G3	Schlecht differenziert

* HPF = high power field (400fache Vergrößerung)

1.2.3 Pathologisches Staging: pTNM-Klassifikation

Postoperativ wird hinsichtlich des pathologisch-anatomischen bzw. histopathologischen Befundes die TNM-Klassifikation der Karzinome vorgenommen. In dieser Klassifikation sind die pathologische (p) Größe des Tumors (T), der Lymphknotenbefall (N) sowie die mögliche Fernmetastasierung (M) enthalten. Tabelle 1.4 stellt die aktuelle pTNM-Klassifikation für das Mammakarzinom dar. Neu ist vor allem die weitere Aufteilung des T1-Stadiums wegen vermehrt kleineren Tumoren durch das Mammographiescreening:

Tab. 1.4a: Klinische pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms

Tumorgröße		N Befallene Lymphknoten	M (Fern-) Metastasen
T0	kein Tumor nachweisbar	N0 keine	M0 keine nachweisbar
Tis	Carcinoma in situ, nicht invasiv	N1 1-3 in der Achsel	M1 nachweisbar (meist Lunge, Leber, Knochen)
T1mic	Mikroinvasion bis 0,1 cm	N2 4-9 in der Achsel	
T1	bis 2 cm	N3 10 oder mehr in der Achsel oder unter/über dem Schlüsselbein	
T2	> 2 cm bis 5 cm		
T3	> als 5 cm		
T4	jede Größe mit Ausdehnung auf die Brustwand oder Haut		

Tab. 1.4b: Stadiengruppierung nach UICC bzw. AJCC (TNM 6. Aufl., 2003) aus der pTNM-Klassifikation:

UICC bzw. AJCC			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium IIA	T0,T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0,T1,T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
Stadium IIIB	T4	N0,N1,N2	M0
Stadium IIIC	Jedes T	N3	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Besonderheiten sind das Suffix „(m)“ bei Vorliegen mehrerer Knoten, wobei der größte Tumor die pT-Klassifikation bestimmt, und das Suffix „(sn)“, sofern die Sentinel-Lymphknoten-Technik ohne axilläre Lymphknotendissektion erfolgt ist. Die pN-Klassifikation beruht auf der Entnahme von mindestens 6 Lymphknoten aus dem Level I und 10 Lymphknoten aus dem Level I und II, intramammäre Lymphknoten gelten als axilläre Lymphknoten und parasternale Lymphknoten entlang der endothorakalen Faszie als regionale Lymphknoten.

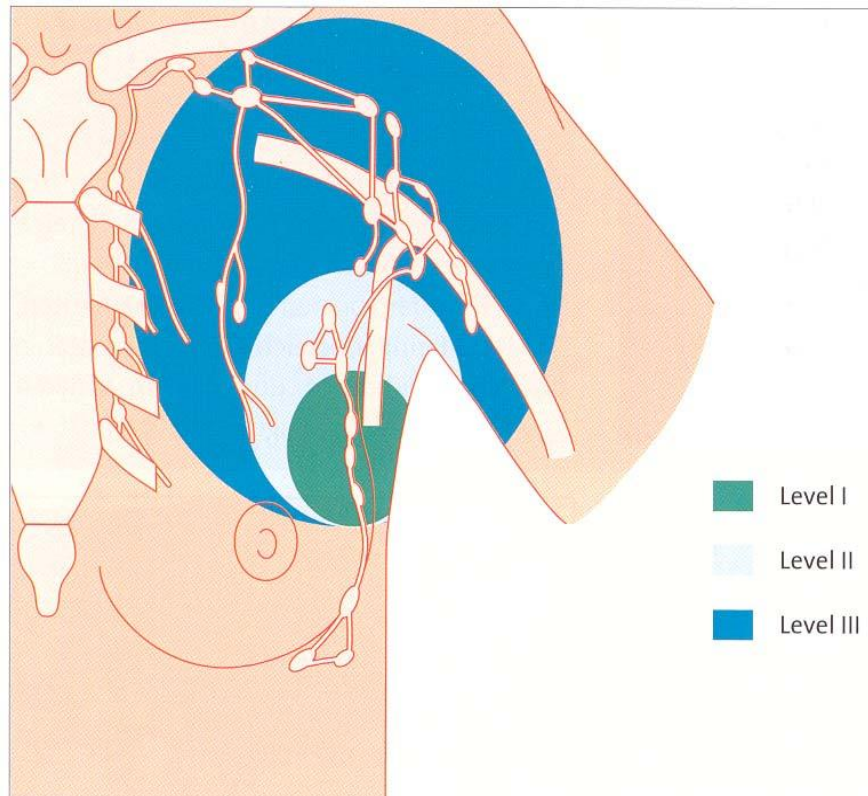


Abb. 1.6: Lymphknotenbereiche Level I-III [aus Regierer et al., 2005]

Level I: Lymphknoten lateral des lateralen Randes des M. pectoralis minor

Level II: Lymphknoten zwischen dem medialen und lateralen Rand des M. pectoralis minor sowie die interpektoralen Lymphknoten

Level III: Lymphknoten medial des medialen Randes des M. pectoralis minor [nach Hayes 2000]

1.2.4 Prognostischer Effekt des axillären Lymphknotenbefalls

Der axilläre Lymphknoten (LK)-status ist der wichtigste prognostische Faktor beim primären Brustkrebs [Schaapveld et al., 2006]. Mit zunehmend neuen adjuvanten Behandlungsschemata steigt die Suche nach Risikofaktoren, wie der Lymphknotenstatus, als Auswahlkriterien einer Behandlungsstrategie [Link et al., 2001]. Schaapveld et al. zeigte in seiner Studie das relative Überleben von Brustkrebspatientinnen in Abhängigkeit von der Anzahl der befallenen, sowie der untersuchten axillären LK. Aus Abbildung 1.7 geht deutlich ein ungünstiger

prognostischer Effekt in Abhängigkeit des axillären Lymphknotenstatus hervor.

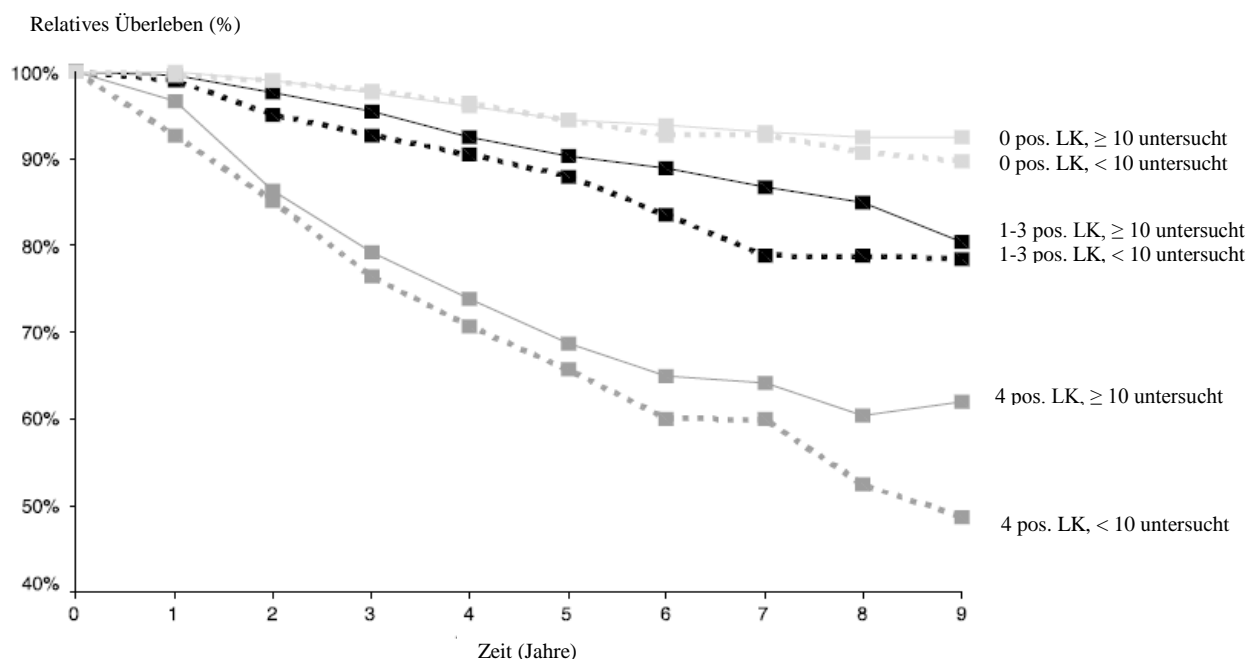


Abb. 1.7: Relatives Überleben beim primären Mammakarzinom in Abhängigkeit vom axillären Lymphknotenstatus

Dies bestätigt die Ergebnisse vorangegangener Studien. Jatoi et al. (1999) beispielsweise fanden ein signifikant schlechteres Outcome nach Rezidiv für Patientinnen mit ≥ 4 befallenen LK bei Erstdiagnose und wertete den Lymphknotenstatus als Prognosefaktor eines aggressiven Phänotypen. Aus Tabelle 1.5 geht die Überlebensrate in Abhängigkeit vom axillären Lymphknotenbefall hervor.

Tab. 1.5: Lymphknotenbefall und Überlebensrate (TZ München) [Schmoll 1999, Bd. 2, S. 1269]

Befallene Lymphknoten	Patientinnenzahl	Absolute u. (rel.) 5-Jahres-Überlebensraten	Absolute u. (rel.) 10-Jahres-Überlebensraten
0	2.245	89% (96%)	77% (71%)
1	488	79% (85%)	59% (71%)
2	326	77% (83%)	55% (65%)
3	208	72% (78%)	51% (62%)
4-6	328	63% (68%)	46% (56%)
7-10	277	50% (54%)	33% (39%)
11-15	163	46% (51%)	16% (20%)
≥ 16	178	33% (37%)	18% (23%)

Es wird gezeigt, dass Patientinnen mit > 10 befallenen LK eine 5-Jahres-Überlebensrate von unter 50% aufweisen und eine 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von einem Drittel, jeweils abnehmend mit Anzahl der befallenen LK. Patienten mit ≥ 10 befallenen LK können

als Hochrisikogruppe für einen schlechten Verlauf angesehen werden und sollten deshalb als Zielgruppe für wirkungsvollere neue adjuvante Behandlungsstrategien gelten. Schon 1993 bezeichneten Peters et al. Patientinnen mit ≥ 10 befallenen LK als sog. Hochrisikogruppe und konnte für diese ein signifikant besseres Outcome zeigen, wenn sie mit einer sog. Hochdosis-Chemotherapie behandelt wurden. Als Vergleichsgruppe dienten gleichwertige Patientinnen aus anderen Studien, die eine konventionelle Therapie erhielten. Gemäß der Konsensusempfehlungen von St. Gallen, 2005, gelten Patientinnen mit ≥ 4 befallenen LK oder mit 1-3 befallenen LK bei gleichzeitiger HER2/neu-Überexpression oder Genamplifikation als Hochrisikogruppe.

1.3 Molekulare Pathogenese

1.3.1 Überblick über die molekulare und zelluläre Biologie beim Mammakarzinom

Genetische Veränderungen können, wie man heute weiß, über Eingriffe in den Zellzyklus eine Tumorgenese hervorrufen bzw. begünstigen. Häufig werden Veränderungen im Genom beobachtet, welche durch zelluläre Deregulation zu neoplastischem Wachstum führen. Ein bisher weit erforschtes Beispiel ist die multifaktorielle Theorie in der Entwicklung des kolorektalen Karzinoms aus seiner Vorstufe, dem Adenom. So werden auch bei der Entstehung des Mammakarzinoms genetische Faktoren angenommen. Weitreichende Erkenntnisse zur genetischen Tumorgenese gibt es zudem bei der hereditären Form des Mammakarzinoms (siehe Abschnitt 1.3). Im Gegensatz dazu steht der nicht familiär bedingte sog. sporadische Brustkrebs. Hier sind die genetischen Veränderungen in den Tumorzellen zu finden und man vermutet eine durch Karzinogene und im Zuge des Alterungsprozesses erworbene Mutationen hervorgerufene Neoplasie [Vogelstein et al., 1988]. Nur Veränderungen in Genen, die für die Zellfunktion verantwortlich sind, können eine maligne Entartung hervorrufen. Man unterscheidet Tumorsuppressorgene (TSG) und (Proto-) Onkogene (Onc). TSG wirken bei ihrer Inaktivierung, Onc bei ihrer Aktivierung tumorinduzierend.

Man unterscheidet zwei Formen genetischer Instabilität in den Tumorzellen [Lengauer et al., 1998]: die chromosomale Instabilität (CIN), die zur Aneuploidie führt, und eine durch Replikationsfehler entstandene Instabilität kurzer Nukleotid-Repeats in kodierenden und nicht-kodierenden Regionen (Mikrosatelliteninstabilität). Die Replikationsfehler resultieren aus der Inaktivierung von TSG, deren Funktion u.a. im Erkennen und Reparieren von DNA-Schäden besteht. Ein Verlust dieser Gene bewirkt daher oft entweder chromosomale Instabilität oder eben Mikrosatelliteninstabilität (MSI) [Cahill et al., 1998]. Genetische Schäden können durch

die fehlende Reparatoren in den Zellen akkumulieren und damit die Progression der Tumorerkrankung beeinflussen.

1.3.2 Onkogen HER-2/neu

Ein in der Entstehung von Brustkrebs wichtiges Onkogen ist das HER-2 Protein, auch bekannt als c-erbB-2 oder -neu. Es gehört in die Unterklasse 1 der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren [Duffy, 2005]. Diese Gruppe von Proteinen besitzt eine extrazelluläre Ligand-bindende Domäne, eine Transmembran-Region, und eine zytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität. Es handelt sich also um transmembranöse Rezeptoren, welche durch Heterodimerisierung als Bindestrukturen für Wachstumsfaktoren dienen.

Bei Tumoren wurde HER-2-Genüberexpression mit erhöhter Mitoserate, maligner Transformation, erhöhter Zellmotilität, Invasivität und Metastasierung assoziiert [Olayioye et al., 2000]. Beim Brustkrebs wurde eine Amplifizierung des HER-2-Gens in 15-30% bei primären invasiven Tumoren gefunden. Das bedeutet, dass anstatt zweier Kopien des Gens pro Zelle bis zu 100 Kopien vorliegen können. Dies wiederum kann zu einer Erhöhung der Rezeptorzahl pro Zelle von 20 000-50 000 auf bis zu 2 Mio. führen. Sowohl Genamplifikation als auch erhöhte HER-2-Expression korrelierten erwiesenermaßen mit ungünstiger Prognose, besonders bei Lymphknoten-positiven Brustkrebspatientinnen [Winston et al., 2004]. Als Beispiel dient eine Studie von Hartmann et al. (1994), in der das mittlere Überleben von Lymphknoten-positiven Brustkrebspatientinnen mit HER-2-Überexpression (20%) 5 Jahre betrug, im Vergleich zu 12 Jahren bei Patientinnen ohne eine solche Überexpression. Da HER-2 in der Pathogenese und Progression bestimmter Brustkrebsarten involviert ist, als Rezeptor extrazelluläre Zugänglichkeit aufweist und in einigen Tumoren überexprimiert ist, dient das Protein als Ziel für tumorspezifische Therapien. Entwickelt wurde ein spezieller Antikörper, der gegen die HER-2-Ektodomäne gerichtet ist und so das Wachstum von Zelllinien mit HER-2- Überexpression unterdrückt. Dieser Antikörper wurde Trastuzumab (HerceptinTM; Genentech Inc.) genannt [Carter et al., 1992]. In einer klinischen Phase II-Studie wurden 15 % der Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs und Rezidiv nach Chemotherapie erfolgreich mit Trastuzumab als Einzeltherapie behandelt [Cobleigh et al., 1999]. Weitere Studien bestätigten dies. Bei gleichzeitig positivem Östrogenrezeptor-Status allerdings scheinen Hormonentzugsbehandlungen mit Aromatasehemmern oder GnRH-Analoga einer Therapie mit Tamoxifen überlegen zu sein [Shou et al. 2004]. Die HER-2-Überexpression wird immunhistochemisch nachgewiesen. Der Nachweis mittels FISH würde auch die intrazelluläre Genamplifikation berücksichtigen, wird aber wegen seiner hohen

Kosten für Therapieentscheidungen selten angewandt. Schließlich wurde die HER-2-Überexpression beim primären Mammakarzinom mit Resistenz gegen adjuvante CMF-Therapie (Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluorouracil) assoziiert [Pegram et al., 1999] und mit verbessertem Ansprechen auf Doxorubicin-enthaltende Therapien [Cancer and Leukemia Group (CALG) B 8541 study]. Zunächst wurde die Verwendung von HER-2 als Prognosefaktor kontrovers diskutiert und gemäß der letzten ASCO Richtlinien („American Society for Clinical Oncology“) für Brustkrebs nicht für Therapieentscheidung sowohl im adjuvanten als auch im metastasierten Setting herangezogen [Bast et al., 2001]. Erst 2005 wurde in der Konsensus-Konferenz von St. Gallen der HER2/neu-Status als negativer Prognosefaktor für die Therapieentscheidung anerkannt.

1.3.3 Tumorsuppressorgen (TSG) p53

Das p53-TSG ist auf Chromosom 17q13 lokalisiert und kodiert ein nukleäres Phosphoprotein bestehend aus 393 Aminosäuren. p53 agiert als Transkriptionsfaktor und ist aus mehreren unterschiedlichen Domänen aufgebaut. Das aminoterminal Ende dient als Transkriptionsaktivator, die zentrale Domäne bindet die sequenzspezifische DNA und das carboxyterminale Ende ist für die Oligomerisation, sprich die Lokalisation des Proteins im Kern, verantwortlich. Das Protein ist als Tetramer aktiv [Velculescu et al., 1996].

p53 ist das am weitesten verbreitete mutierte Gen in humanen Tumoren [ebd.]. Meistens handelt es sich um Missense-Mutationen in dem DNA-bindenden Abschnitt, der mit dem Verlust seiner sequenzspezifischen Funktion einhergeht [Duffy, 2005]. Das Protein kontrolliert die Expressierung verschiedener Gene, die sich wiederum in vier Kategorien einteilen lassen: Zellzyklus-Inhibition, Apoptose, Kontrolle der genomischen Stabilität und Angiogenese-Inhibition [Vogelstein et al., 2000]. Dies erklärt die Beteiligung des Funktionsverlustes von p53 an der Tumorgenese.

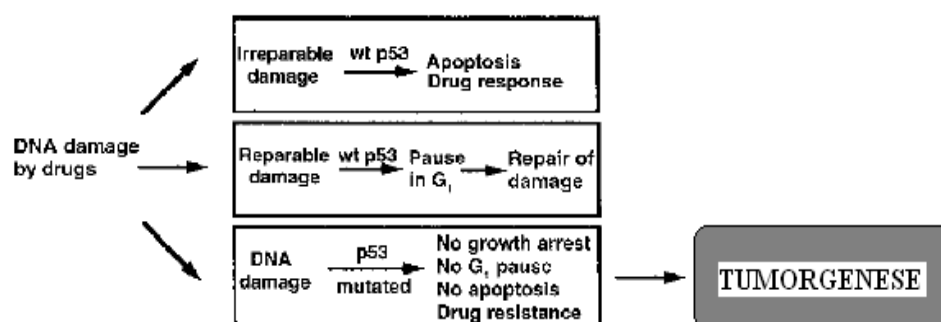


Abb. 1.8: Beseitigung von DNA-Schäden durch p53 und Effekte der p53-Inaktivierung durch Mutationen

Die biochemischen Mechanismen der Aktivierung bzw. Inaktivierung von p53 sind bereits

umfassend erforscht worden. In normalen Zellen wird das Protein durch MDM2 inaktiviert. p53 selbst wird über unterschiedliche Mechanismen durch Stressoren, wie DNA-Schäden, Onkogen-Aktivierung, Hypoxie, Depletion des zellulären Nukleotid-Pools oder Defekten in der DNA-Methylierung aktiviert. In seiner Funktion als „Wächter des Genoms“ [Lane, 1992] ist es zuständig für die Signaltransduktion zur Auslösung einer zellulären Antwort. Ein DNA-Schaden beispielsweise führt zur Inaktivierung von MDM2 über Phosphorylierung von p53 und MDM2, was zur Dissoziation des p53-MDM2-Komplexes und so zur Aktivierung von p53 führt. p53 kann durch Bindung an das WAF1-Gen (Wildtype-Activated-Factor1-Gene) das Protein p21 transkribieren, welches den Stillstand des Zellzyklus in der G1-Phase auslöst, bevor die Synthesephase eingeleitet werden kann. Schlägt dies fehl, so induziert p53 den programmierten Zelltod (Apoptosis), um die Weitergabe von mutiertem, potentiell onkogenem Genmaterial auf Tochterzellen zu verhindern. Kommt es nun zum mutationsbedingten Ausfall von Mediatoren der Signaltransduktion und damit zum Funktionsverlust von p53, so ist eine Tumorprädisposition gegeben. Beispielsweise wird beim Li-Fraumeni-Syndrom eine p53-Keimbahnmutation beobachtet, die zur Inaktivierung des TSG führt. Li-Fraumeni ist mit einer erhöhten Inzidenz für Brustkrebs assoziiert.

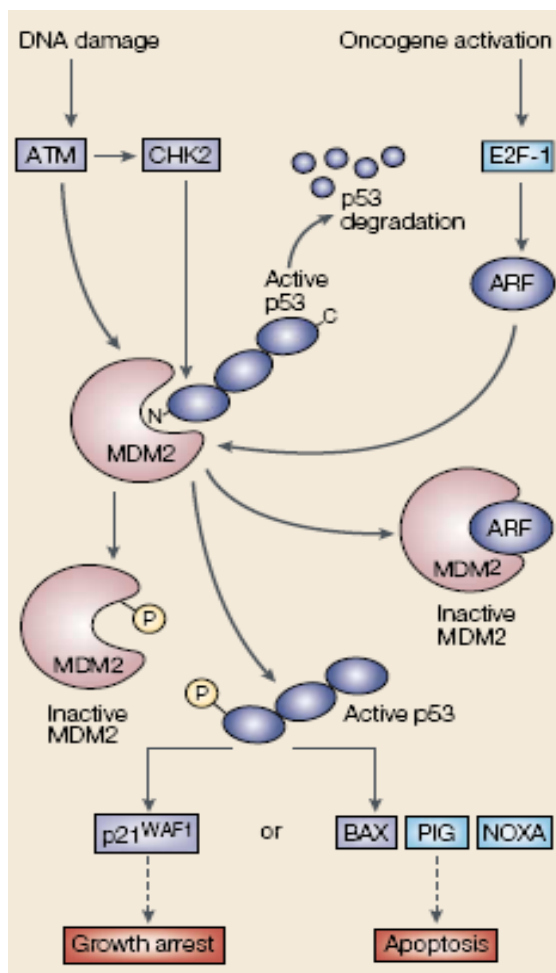


Abb 1.9: p53 Signaltransduktion bei zellulärer Homöostase und Krebs [Soussi et al., 2001]

Mutationen des p53-TSG selbst werden in 18-45% der Mammakarzinome gefunden. [Hensel et al., 2002] Es kommt zu einer Anreicherung des mutierten p53 im Vergleich zum p53-Wildtyp, was immunhistochemisch nachweisbar ist [Finlay et al., 1988]. Eine weitere Methode zum Nachweis von Mutationen ist die Sequenzierung.

1.3.4 Karyopherin α_2

Zudem haben wir die molekulare Untersuchung unserer Gewebepaare auf einen weiteren prognostischen und prädiktiven Faktor, das Karyopherin α_2 (KPNA2), in der Literatur auch oft als Importin α bezeichnet, ausgeweitet. Dieses molekulare Markerprotein aus der Gruppe der Karyopherine wurde von Chook et al. 1999 als Adapterprotein dem nukleozytoplasmatischen Transport zugewiesen. Während kleine Moleküle über Porenkomplexe in den Zellkern gelangen, benötigen Moleküle ab einer Größe von 40 kDa ein spezielles Importsystem. Die Karyopherine α und β dienen hierbei als Importproteine. KPNA2 ist als löslicher Rezeptor mit den Nukleoporinen, welche die Porenkomplexe bilden, verbunden und dient als Andockstelle für solche Makromoleküle. Diese erkennt es über ein klassisches Kernlokalisierungssignal (NLS) und schleust sie dann über den Transfer an Karyopherin β in den Zellkern ein [Chook and Blobel, 2001]. Dieser Transport ist abhängig von der Konzentration an GTPase Ran gebundenem GTP im Zellkern. KPNA2 bindet nur in Abwesenheit von RanGTP. In dessen Anwesenheit setzt es das gebunden Molekül wieder frei [Gorlich et al., 1996b]. Ein über dem nukleären Porenkomplex (NPC) bestehender RanGTP-Gradient bestimmt so den Import und Export von Makromolekülen in den Zellkern [Bischoff und Ponstingl, 1991]. Die Funktionsweise dieses Transportsystems soll in Abb. 1.10 veranschaulicht werden.

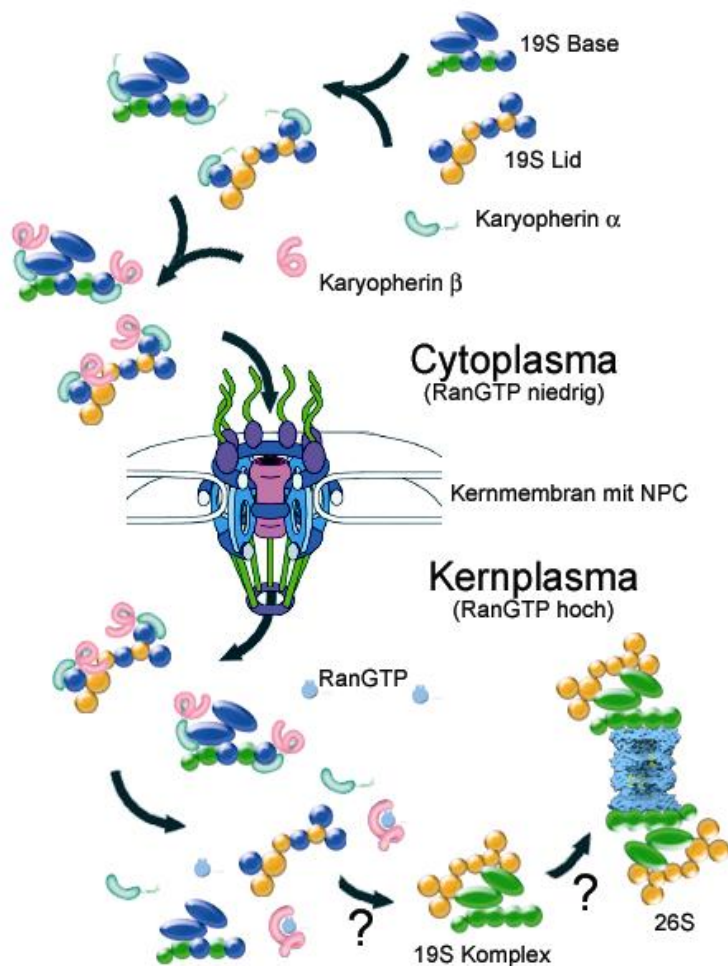


Abb. 1.10: Modell für die Importfunktion von Karyopherin α/β (<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/wendler-petra-2004-05-28/HTML/chapter4.html>, 01.09.08)

Eine der Aufgaben des Importproteins KPNA2 ist die Internalisierung von NBS1 in den Zellkern. NBS1 fungiert als Tumorsuppressor, indem es die genomische Integrität im Zellkern schützt, besitzt aber wohl auch eine mit dem PI3-Kinase/AKT-Aktivierungspfad assoziierte onkogene Rolle im Zytoplasma [Teng et al., 2006]. Es ist ein Regulator des MRE11/RAD50/NBS1-(MRN)-Komplex [Carney et al., 1998; Trujillo et al., 1998; Paull und Gellert, 1999]. Der MRN-Komplex detektiert dsDNA-Brüche und aktiviert die DNA-Reparatur [Stracker et al., 2004]. KPNA2 interagiert nun mit NBS1 und führt somit zur Internalisierung des MRN-Komplexes in den Zellkern [Tseng et al., 2005]. Der MRN-Komplex ist somit ein wichtiger Baustein im DNA-Reparatur-Mechanismus. Er arbeitet als Sensor für DNA-Brüche und fungiert als Aktivator von sog. Checkpoints für DNA-Schäden im Zellzyklus. Zusätzlich beeinflusst er die DNA-Reparatur mittel Rekombination zwischen Schwesterchromatiden [Stracker et al., 2004]. Eine hohe KPNA2-Aktivität könnte als ein Hinweis auf den Bedarf vermehrter DNA-Reparatur bzw. auf eine nicht ausreichend funktionierende DNA-Reparatur gewertet werden, also als Zeichen erhöhter DNA-Schädigung.

Die immunhistochemischen Untersuchungen von Dahl et al., 2006 ergaben eine deutliche

KPNA2-Expression in Brustkrebszellen gegenüber einer schwachen bis fehlenden Expression von KPNA2 im Normalgewebe. Weiterhin konnten sie eine unabhängig negative Korrelation zwischen KPNA2-Expression im Primärtumor und dem Gesamtüberleben bei LK-positiven Brustkrebspatientinnen aufzeigen.

1.3.5 Genetische Instabilität

Einen wichtigen Aufgabenkomplex in der Brustkrebsforschung stellt die Suche nach molekularen Veränderungen dar, die an der Tumorgenese beteiligt sind, um diese als molekulare Marker für Screening, Diagnostik und Prognose oder als Zielstrukturen zur Krebstherapie zu verwenden [Duffy, 1993].

Eine Methode zum Nachweis genetischer Veränderungen ist die sog. Mikrosatellitenanalyse (MA). Mit ihrer Hilfe lassen sich schnell und relativ einfach zwei wesentliche molekulare Mechanismen der genomischen Instabilität erfassen: Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Loss of Heterozygosity (LOH). Als LOH bezeichnet man das Verschwinden einer Allel-Bande im Tumor (Deletion), MSI bedeutet das Auftreten zusätzlicher Banden im Tumor bzw. die Verschiebung von Allel-Banden (*band shift*).

Voraussetzung für die Auswertung ist, dass mehrere (mindestens zwei) Mikrosatelliten-Marker eine Instabilität zeigen [Jass et al., 1998; Rüschoff et al., 1997; Lothe et al., 1993].

1.3.5.1 Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Genetische Instabilität in Form von Mutationen in repetitiven Sequenzen und eine erhöhte Rate von Punktmutationen werden häufig bei soliden Tumoren gefunden. Diese Form der genetischen Instabilität wird durch die sog. Mikrosatelliteninstabilität (MSI) charakterisiert, welche durch Mutationen in den hMLH1- und hMSH2-Genen verursacht werden kann. [Adem et al., 2003] Diese Mutationen bedingen die Inaktivierung von Mismatch-Repair-(MMR)-Mechanismen, d.h. die Reparatur in der Keimbahn auftretender Nukleotid-Fehlpaarungen in kurzen repetitiven DNA-Sequenzen, sog. Mikrosatelliten, unterbleibt. Dies führt durch Akkumulation von Deletionen bzw. Insertionen zu Veränderungen in der Länge dieser repetitiven DNA-Sequenzen. [Kuligina et al., 2006] Mikrosatelliten kommen als repetitive DNA-Sequenzen von bis zu sechs Basen 100.000-fach im Genom verteilt vor. Meistens handelt es sich um (A)_n-Repeats gefolgt von (CA)_n-Repeats mit ca. 50.000-100.000 Loci, wobei die Anzahl der Wiederholungen (n) normalerweise zwischen 10 und 60 schwankt [Weber et al., 1989]. Mikrosatelliten-DNA findet sich am häufigsten in nicht-kodierender DNA, kommt aber auch in bestimmten kodierenden Abschnitten vor. Die durch den Funktionsverlust der MMR-Proteine auftretenden Mismatches lassen sich mittels PCR als

MSI nachweisen.

MSI wurde zuerst 1993 beim kolorektalen Karzinom (CRC) als „replication-error-phenotype“ (RER+) beschrieben [Boland et al., 1998, Ionov et al., 1993, Thibodeau et al., 1993, Aaltonen et al., 1994]. Die beschriebenen Keimbahnmutationen in Genen des DNA-Mismatch-Repairs (MLH1, MSH2, MSHC) wurden als Ursache für das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) gefunden [Fishel et al., 1993, Aaltonen et al., 1994]. Studien zum Kolonkarzinom haben eine hohe Korrelation zwischen dem Vorkommen von MSI und dem Verlust der hMLH1- und hMSH2-Expression gefunden [Thibodeau et al., 1996, Marcus et al., 1999, Halling et al., 2001]. Während 90% aller HNPCC-assoziierten Kolonkarzinome MSI-positiv sind, gilt dies beim sporadischen CRC nur für 15%. So bietet sich die Mikrosatelliten-Analyse (MA) als Screening auf HNPCC an. Verwendet werden mindestens fünf definierte Mikrosatelliten-Marker zur Untersuchung der DNA von Normal- und Tumorgewebe eines Patienten. Werden im Vergleich zum Normalgewebe im Tumor MSI bei ≥ 2 der 5 Marker entdeckt, folgt zum molekularen Beweis einer vererbten Keimbahnmutation die Sequenzierung der MMR-Gene im EDTA-Blut oder Normalgewebe. Für die Wahl des zu sequenzierenden Gens kann immunhistochemisch nach Expressionsverlust von hMSH2 oder hMLH1 gesucht werden [Rüschoff et al., 1998]. Bei negativem Testergebnis der Sequenzierung ist ein HNPCC-Syndrom nicht zu beweisen, aber auch nicht auszuschließen, da in 40% keine Mutation gefunden wird.

Beim Brustkrebs wurden MSI in 0-30% der Fälle nachgewiesen [Vaurs-Barriere et al., 2000, Paulson et al., 1996, Yee et al., 1994, Sourvinos et al., 1997, Toyama et al., 1996, Schmitt et al., 1999]. Demgegenüber sind Veränderungen in der hMLH1- und hMSH2-Expression beim familiären BRCA1/2, sowie beim sporadischen Brustkrebs, einschließlich den medullären Karzinomen sehr selten [Adem et al., 2003]. 1997 wurde in einem internationalen Workshop über MSI- und RER-Phänotypen in der Krebsdiagnostik und familiären Prädisposition das sog. Bethesda-Panel für die MSI-Analyse von „Kolon-assoziierten Tumoren“ entwickelt. Dabei wurden spezielle Marker (BAT25, BAT26 (Mononukleotide), Mfd15, APC und D2S123 (Dinukleotide)) sowie Kriterien zur Mikrosatelliten-Analyse (MA) festgesetzt [Kuligina et al., 2006, Boland et al., 1998]. Müller et al. schloss mit seiner Studie von 2002 den Brustkrebs als integralen Tumor von den HNPCC-Tumoren aus. Beim Mammakarzinom bedarf es wegen verschiedener Länge der Mikrosatelliten eines angepassten Panels an Markern, welche auch die häufiger betroffenen Tri- bzw. Tetranukleotid-Repeats auf MSI untersuchen [Wooster et al., 1994, Boland et al., 1998, Peltomäki, 2003]. Da es bis dato kein an das Mammakarzinom angepasstes Panel an Markern zur MA gab, verwendete

Wild et al. in seiner Studie das oben genannte Panel und fügte drei Dinukleotid-Marker mit hoher Sensitivität für MSI-Nachweis beim CRC (BAT 40, TP53 Als) hinzu. Weiterhin wählte er 8 Tri- und Tetranukleotid-Marker mit hoher Sensitivität für MSI-Detektion beim Mammakarzinom entsprechend der Literatur aus [Wild et al., 2000]. Anhand des neu generierten Panels konnten in 33% der Tumore MSI bei jeweils mindestens 3 von 15 untersuchten Markern und in 51% bei jeweils 1-2 Mikrosatelliten-Markern nachgewiesen werden. Vier Jahre später publizierten Wild et al. die erste vergleichende Studie zur Untersuchung der Prädiktivität von MSI beim primären Mammakarzinom bezüglich des progressionsfreien Überlebens (PFS), sowie des Gesamtüberlebens (OS) nach HDCT/ASZT. Verwendet wurde das oben genannte Panel an MS-Markern. Bei 13 von 39 untersuchten Patientinnen (33%) konnten MSI nachgewiesen werden, vor allem für die Tetranukleotid-Marker. Alle MSI-positiven Tumore zeigten eine normale Expression von hMLH1 und hMSH2. Aus der folgenden Abbildung geht hervor, dass MSI signifikant mit geringerem PFS und OS assoziiert war.

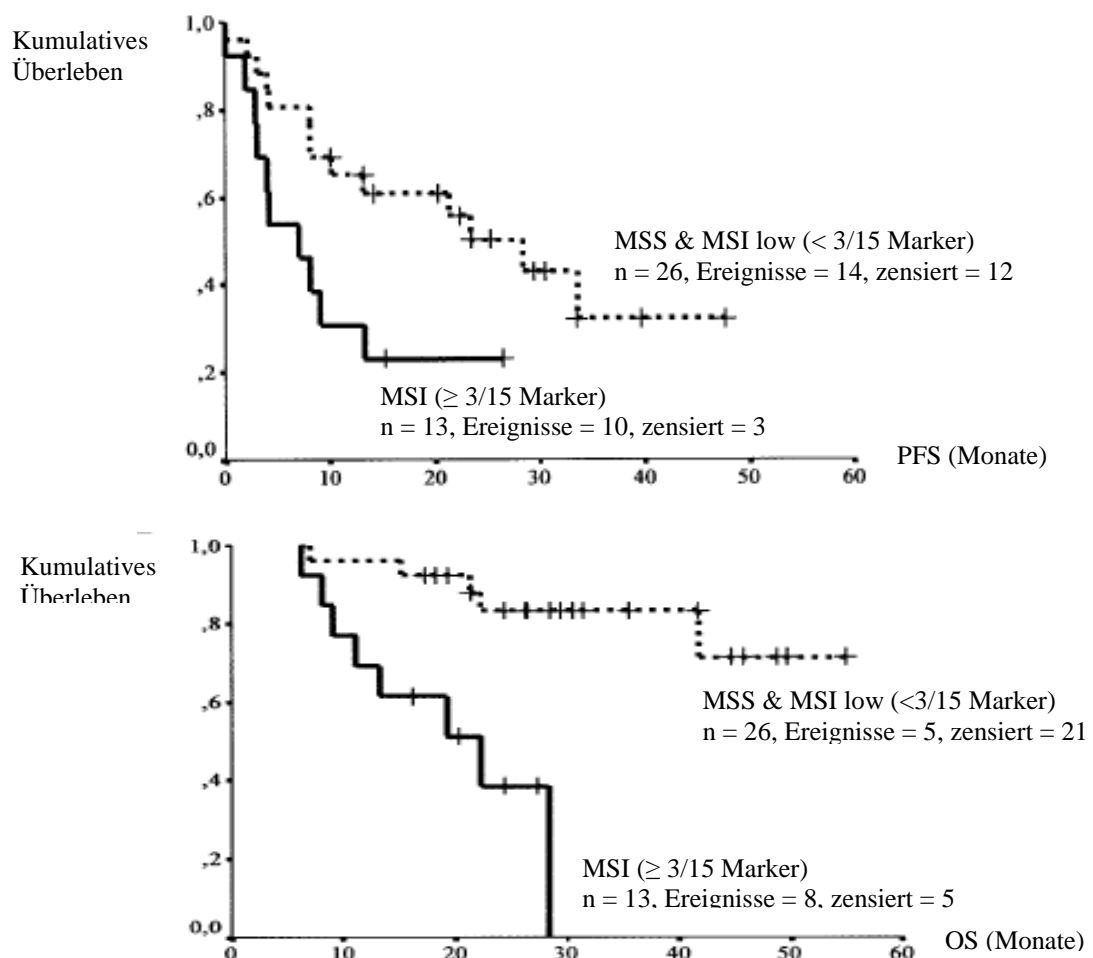


Abb. 1.11: Verteilung von PFS/OS beim fortgeschrittenen Mammakarzinom nach HDCT/ASZT bezüglich den Variablen MSS (Mikrosatelliten stabil), MSI (Mikrosatelliten instabil) und MSI low nach Wild et al., 2000

1.3.5.2 Loss of heterozygosity (LOH)

LOH bezeichnet den Verlust eines Allels für welches der Organismus heterozygot ist, sprich Allele mit unterschiedlichen DNA-Sequenzen, infolge vorausgegangener Mutation eines Allels. Die molekularen Ursachen, die zum Verlust eines Allels führen können, sind generell komplex und beinhalten multifokale Deletionen, mitotische Rekombination oder nondisjunktionalen Chromosomenverlust, ebenso wie Genkonversion und Punktmutation [Meuth, 1990]. Eingeführt wurde der Begriff durch Knudson und dessen „Two-Hit-Hypothese“ (1985) zur Erklärung des Funktionsverlust eines Gens. Initial besteht demnach eine Keimbahnmutation im ersten Allel, als „first hit“ bezeichnet, auf die der Verlust des zweiten Allels über oben genannte Mechanismen und somit der Verlust der Heterozygotität (LOH), sog. „second hit“, folgt. Knudson erklärte so den Funktionsverlust von Suppressorgen und deren Beitrag zur Tumorentstehung.

LOH ist die häufigste genetische Abnormität bei Brustkrebs [Tseng et al. 1997] und weist nach übereinstimmender Meinung auf die chromosomalen Loci hin, die TSG enthalten [Powierska-Czarny et al., 2003, Ando et al., 2000]. Andererseits können LOH als Hinweis auf chromosomale Instabilität gewertet werden, ohne dass sie spezifisch auf Gendefekte deuten. Dies erschwert die Identifizierung chromosomaler Regionen, die wirklich mit Tumorgenese assoziiert sind [Wang et al., 2004]. Exemplarisch für den Zusammenhang von LOH und Funktionsverlust eines Gens mit daraus resultierender Tumorgenizität, ist das p53- Gen. In vielen Tumoren werden LOH im Chromosom 17p nachgewiesen, wo u.a. das p53-Gen lokalisiert ist [Querzoli et al., 2001]. Beim Mammakarzinom wurden LOH in 85% an verschiedenen Stellen im Chr. 17p gefunden [Futreal et al., 1992]. Bis dato wurden eine große Anzahl an Chromosomen beim invasiven Brustkrebs auf LOH untersucht. In den Chromosomen 1q, 3p, 6q, 11p, 13q, 16q, 17p, 17q und 18q konnten zahlreiche LOH nachgewiesen werden [Devilee et al., 1989, Iwase et al., 1995, Takita et al., 1992]. Abnormitäten, wie LOH und MSI sind von großer Signifikanz für die klinische Diagnostik. Ziel ist es, deren leicht durchzuführende Analyse als molekulares Screening sowohl für hereditäre, als auch sporadische Neoplasien zu verwenden [Jass et al., 1995, Aaltonen et al., 1998].

1.3.5.3 Hereditäres Mammakarzinom

Während der überwiegende Anteil der Mammakarzinome sporadisch auftritt, sprich durch erworbene genetische Veränderungen und einwirkende Karzinogene verursacht wird, sind 5 bis 10% der jährlich auftretenden Brustkrebsfälle hereditären Ursprungs. Keimbahnmutationen wurden in den Brustkrebsgenen BRCA1 und BRCA2, sowie in den

Genen, die p53, ATM und PTEN kodieren, entdeckt. Letztere sind selten und mit bestimmten Syndromen vergesellschaftet:

Tab. 1.6: Genmutation-assoziierte Syndrome mit erhöhter Inzidenz für Brustkrebs

Gen	Syndrom
BRCA1, BRCA2	hereditäres Mammakarzinom
p53	Li- Fraumeni- Syndrom
ATM	Ataxia-Teleangiektasia
PTEN	Cowden- Syndrom

Das BRCA1-Gen – 1990 auf Chromosom 17q lokalisiert – besteht aus 22 Exons und kodiert ein Protein mit 1863 Aminosäuren [Miki et al., 1994]. Das BRCA2-Gen – 1995 auf Chromosom 13q lokalisiert – besitzt 26 Exons und kodiert ein aus 3418 Aminosäuren bestehendes Protein [Wooster et al., 1995]. Funktionell scheinen die beiden Tumorsuppressorgene an der DNA-Reparatur beteiligt zu sein, BRCA1 ferner noch in die Apoptose involviert [Scully et al., 2000, Xu et al., 2001, Thangaraju et al., 2000].

Mutationen in BRCA1 scheinen 50%, in BRCA2 ca. 30% der genetisch bedingten Mammakarzinome auszumachen [Ford et al., 1998]. Ein mutiertes BRCA1-Gen führt dazu, dass bis zu 80% der betroffenen Frauen an Brustkrebs erkranken [Foulkes, 2006]. Von diesen entwickeln 60% zudem einen zweiten Tumor. Mehr als 50% erkranken vor dem 50. Lebensjahr, was eine sehr ungünstige Prognose mit sich bringt. Es führt also zu einer deutlichen Erhöhung des Brustkrebsrisikos. Das Risiko für Ovarialkarzinome ist mit 40-60% bis zum 70. Lebensjahr erhöht, für Kolonkarzinome besteht ein 3-fach, für Prostatakarzinome ein 4-fach erhöhtes Risiko. Weiterhin wurden in Familien mit BRCA1-Mutationen gehäuft Haut-, Magen- und Rektumkarzinome beobachtet. BRCA1-assoziierte Mammakarzinome weisen zwar häufiger ein höheres Grading und vermehrte zelluläre Veränderungen im Vergleich zu sporadischen Karzinomen auf [Strathon, 1996], die Überlebensprognosen gleich eingestufte Karzinome sind aber nicht verschieden [Verhoog et al., 1998, Johansson et al., 1998, Wagner et al., 1998]. Die Häufigkeit von BRCA1-Mutationen wird auf 1:500-800 bezogen auf die Gesamtbevölkerung geschätzt.

Mutationen in BRCA2 führen zu etwa gleich erhöhtem Brustkrebsrisikos bei Frauen, zusätzlich steigt das der Männer auf ca. 6% an [Haraldsson et al., 1998].

Für die Entstehung des sporadischen Mammakarzinoms sind BRCA1 und BRCA2 jedoch ohne Bedeutung [Beckmann et al., 1996]. So konnten beim sporadischen Mammakarzinom keine BRCA1-Mutationen gefunden werden [Hosking et al., 1995].

1.4 Hochdosis-Chemotherapie (HDCT) mit autologer Stammzelltransplantation (ASZT)

Mit dem Anstieg der Inzidenz des Mammakarzinoms stellt sich die Aufgabe der Entwicklung neuerer und potenterer Therapiekonzepte zur Verbesserung der Rezidivrate und des Gesamtüberlebens. Die Chemotherapie, adjuvant nach oder neo-adjuvant vor chirurgischer Therapie, gilt heute als wichtigstes Therapeutikum in der Onkologie. Beim Mammakarzinom ist zwar der primäre Tumor meist gut operativ behandelbar, problematisch sind jedoch der Lymphknotenbefall, die Häufigkeit von Fernmetastasen, sowie die unentdeckte Mikrometastasierung zum Zeitpunkt der Diagnose. Je nach Anzahl der befallenen Lymphknoten beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate zwischen 18% und 77% [Schmoll, 1999]. Bei Metastasierung beträgt das mittlere Gesamtüberleben lediglich 2 Jahre und das 5-Jahres-rezidivfreie Überleben nach anthracyclin-haltiger Chemotherapie maximal 3 % [Clark et al., 1987, Greenberg et al., 1996, Tomiak et al., 1996]. So wurden bei der adjuvanten Therapiewahl beim Mammakarzinom zwei Gruppen an Patientinnen ausgewählt, die von einer HDCT mit anschließender ASZT profitieren könnten: Hochrisikopatientinnen mit ≥ 10 befallenen axillären Lymphknoten und Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom.

Das bereits bei hämatologischen Erkrankungen, wie Lymphomen und Keimzelltumoren eingesetzte Verfahren der hochdosierten Chemotherapie mit und ohne Bestrahlung und nachfolgender Gabe autologer Knochenmarkstammzellen [Gulati et al., 1993, Broun et al., 1992] erbrachte ein verlängertes rezidivfreies Überleben. Bei den meisten Chemotherapeutika stellte die Myelotoxizität den begrenzenden Faktor einer Dosisescalation dar. Um dieses Problem zu beheben, wurde zunächst vor der HDCT operativ Knochenmark (KM) entnommen und nach erfolgter Chemotherapie i.v. retransfundierte. Somit konnte die Regeneration der Hämatopoese beschleunigt und die Hämatotoxizität der Dosisescalation reduziert werden. Die Gefahr schwerer Infektionen in der Aplasiephase konnte so gesenkt werden. Die KMT wird heute durch ASZT ersetzt. Stammzellen werden durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren (G-CSF = Granulocyte-Colony-Stimulating-Factor) aus dem KM ins Blut mobilisiert und dann per Leukapherese abgesammelt, um post-CT wieder retransfundierte zu werden.

Für das Mammakarzinom konnte in vitro und in vivo eine Dosis-Wirk-Beziehung nachgewiesen werden, vor allem für die Alkylanzien [Frei et al., 1989; ebd. et al., 1988; Teicher et al., 1988]. Als chemosensibler Tumor ist das Mammakarzinom für eine solche Therapieintensivierung besonders geeignet, v.a. da es auf viele verschiedene Zytostatika gut anspricht.

1.4.1 Adjuvante Therapie bei Hochrisikopatientinnen

1993 veröffentlichte Peters et al. seine Phase-II-Studie zur HDCT mit ASZT bzw. AKMT bei Mammakarzinom-Patientinnen mit ≥ 10 befallenen axillären LK. Nach radikaler Mastektomie und konventioneller Therapie folgte eine HDCT mit Cyclophosphamid, Cisplatin und BCNU mit ASZT bzw. AKMT, sowie einer Nachbestrahlung der Thoraxwand und regionärer Lymphknoten. Rezeptor-positive Patientinnen erhielten Tamoxifen über 5 Jahre. Somit konnte ein rezidivfreies Überleben von 71% und ein Gesamtüberleben von 78% nach 5 Jahren erzielt werden. Im Vergleich dazu wurde bei 257 Patientinnen aus drei Studien (CALGB 8541: Hoogstratten et al., 1976, CALGB 8082: Lichtman et al., 1991, und CALGB 7581: Tormey et al., 1983) mit konventioneller Therapie nach 5 Jahren nur ein rezidivfreies Überleben zwischen 28% und 34% und ein Gesamtüberleben zwischen 37% und 48% erreicht. In einer ähnlichen Studie von Gianni et al. wurden die Patientinnen einer HDCT mit Cyclophosphamid, Cisplatin, Methotrexat und Mephalan unterzogen. Dabei ergab sich nach 4 Jahren ein geschätztes rezidivfreies Überleben von 57% und ein Gesamtüberleben von 70%. Als Vergleich diente hier die Studie von Bonadonna et al., deren 58 Patientinnen nach effektiver Standardtherapie ein rezidivfreies Überleben von 41% und ein Gesamtüberleben von 60% nach 5 Jahren aufwiesen. Kritisiert wurde, dass in den jeweiligen Vergleichsgruppen nicht alle Patientinnen nachbestrahlt wurden. Während bei Peters et al. die therapie-assoziierte Mortalität noch 12% betrug, konnte diese bei Gianni et al. auf 2% gesenkt werden. Bei der Bearman-Studie war die Nachbeobachtungszeit zu kurz, um signifikante Aussagen bezüglich rezidivfreiem Überleben und Gesamtüberleben zu treffen. Bis dato können aus retrospektiven Studien in der adjuvanten Situation bei Hochrisikopatientinnen mit Mammakarzinom ein 20-40%iger Vorteil bezüglich des rezidivfreien Überlebens und ein 10-35%iger Vorteil bezüglich des Gesamtüberlebens zugunsten der HDCT/ASZT bei einer therapie-assoziierten Mortalität von 2-3% angenommen werden [Quelle: Onkologie heute: Mammacarcinom, 1999].

Tab. 1.7: Phase I/II-Studien zur adjuvanten HDCT mit ASZT bei Patientinnen mit Brustkrebs und mehr als vier axillären Lymphknotenmetastasen mit aussagekräftigen Nachbeobachtungszeiten

Autor	n	Lk-Befall	HDCT-Strategie	PFS	Mortalität	OS
Peters et al., 1993/95	85	≥ 10	„late-intensification“	71% (5J)	12%	78% (5J)
Gianni et al., 1997	63	≥ 10	„late-intensification“	57% (4J)	2%	70% (4J)
Bearman et al., 1997	52	4–9	„late-intensification“	88% (2,9J)	2%	82% (2,9J)

Lk: Lymphknoten; PFS: Progrefreies Überleben; OS: Gesamtüberleben; J: Jahre;
 „late-intensification“: mehrere Zyklen einer konventionellen Therapie, im Anschluß HDCT

2003 wurden die Ergebnisse der WSG-AM01-Studie der ASCO präsentiert. Die WSG (Westdeutsche Studiengemeinschaft) wurde 1994 an der Universitätsklinik Düsseldorf gegründet und beschäftigt sich mit der adjuvanten Therapie beim Hochrisiko-

Mammakarzinom. In der Studie wurden 403 Patientinnen mit mehr als neun befallenen Lymphknoten behandelt und deren Verlauf über eine mittlere Nachbeobachtungszeit von 48,6 Monaten verfolgt. Die Teilnehmer erhielten randomisiert entweder eine dosisdichte Chemotherapie mit vier Zyklen EC (Epirubicin/ Cyclophosphamid) gefolgt von drei Zyklen CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil) oder eine HDCT mit den Substanzen Cyclophosphamid und Thiotepa, die sich aus anderen Studien beim Mammakarzinom als hoch effektiv erwiesen. In der HDCT-Gruppe wurde ein durchschnittliches ereignisfreies Überleben (EFS) von 76,1 Monaten erreicht, in der Standard-Gruppe bei dosisdichter Therapie betrug das EFS 40,6 Monate. Auch im medianen Gesamtüberleben (OS) war die HDCT signifikant überlegen. Therapie-assoziierte Sterbefälle gab es in beiden Gruppen nicht. Die folgenden Graphen geben die Auswertung der Studie wieder:

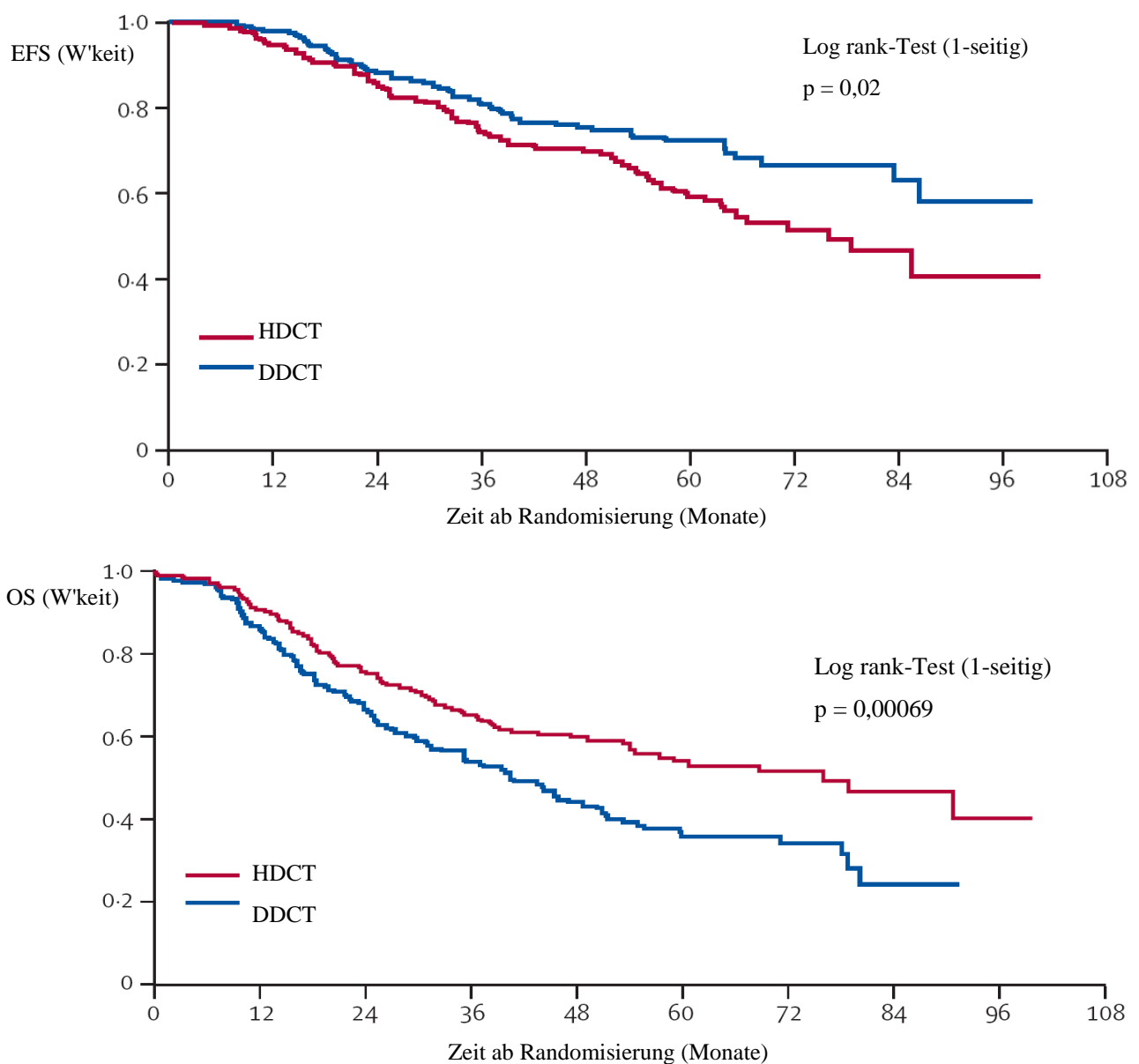


Abb. 1.12: Ereignisfreies Überleben und Gesamtüberleben der WSG-AM01-Studie [Nitz et al., 2005]

Die Studie der WSG war international die viertgrößte ihrer Art und bislang die erste, die eine Überlegenheit der HDCT nachweisen konnte. Weitere Studien auf diesem Gebiet sollten folgen.

1.4.2 Metastasiertes Mammakarzinom

Erstmals wurde die HDCT beim metastasierten Mammakarzinom Mitte der 80er Jahre angewandt. Die zunächst hohe HDCT-assoziierte Mortalität von 23% [Peters et al., 1988] konnte sukzessiv gesenkt werden und beträgt bis heute noch ca. 2% [Schmid et al., 2005]. Erste vergleichende Studien konnten eine Verbesserung des rezidivfreien Überlebens bei gleichbleibendem Gesamtüberleben durch HDCT im Gegensatz zu Standard-Dosis-Chemotherapie (SDCT) nachweisen. Diese ersten Ergebnisse führten bei den Onkologen zu einer positiven Resonanz und so wurden weltweit viele Patientengruppen mit Mammakarzinom mittels HDCT therapiert.

Tab 1.8: Phase-II-Studien zu HDCT beim metast. Mammakarzinom von Ende der 80er bis Mitte der 90er Jahre aus Tartarone et al., 2003

Autor	Jahr	Pat.-Zahl	HDCT-Strategie	CR (%)	OR (%)	Mortalität therapie-assoz.	Beobachtungszeit (Monate)
Peters et al.	1988	22	CBP	54	73	23	10
Kennedy et al.	1991	30	CT	46	100	0	22
Williams et al.	1992	27	CT	55	86	14	15
Antman et al.	1992	29	CTCb	45	100	3	>20
Dunphy et al.	1994	80	CVP2x	55	79	9	15
Perry et al.	1994	14	CTCb	36	86	0	NA
Ayash et al.	1995	62	CTCb	29	88	5	24
Silverman et al.	1995	17	CTCb	29	88	0	NA
Cameron et al.	1996	32	L-Pam/VP16/TSPA	53	100	0	15
Gisselbrecht et al.	1996	60	CMA	60	86	11	26
Weaver et al.	1996	118	CTCb	43	66	0	NA
Bitran et al.	1996	27	CT/L-PAM	56	67	0	>30
Ayash et al.	1996	67	L-PAM/CTCb	33	62	1	20
Lelli et al.	1997	18	ICE	78	100	0	36

CBP: Cyclophosphamid+BCNU+Cisplatin; CT: Cyclophosphamid+Thiotepa; CTCb: Cyclophosphamid+Thiotepa+Carboplatin; CVP: Cyclophosphamid+Etoposid+Cisplatin; ICE: Ifosfamid+Carboplatin+Etoposid; CMA: Cyclophosphamid+Mitoxantron+Mephalan; CR: komplette Ansprechrte; OR: Gesamt-Ansprechrte; NA: nicht verfügbar

Es kam zu einer vermehrten Anwendung der HDCT bei Hochrisikopatientinnen mit ausgedehnter axillärer Lymphknotenmetastasierung bzw. Fernmetastasen.

1995 veröffentlichten Bezwoda et al. die Ergebnisse ihrer randomisierten Phase-III-Studie, in der 90 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom entweder mit Cyclophosphamid, Mitoxantron und Vincristin als konventionelle Chemotherapie (6-8 Zyklen) oder initial mit hochdosiertem Cyclophosphamid, Mitoxantron und Etoposid mit nachfolgender Stammzelltransplantation (2 Zyklen) behandelt wurden. Es konnte bei HDCT eine signifikante Verbesserung in der Gesamtansprechrte, im Gesamtüberleben, sowie im

rezidivfreien Überleben verglichen mit SDCT nachweisen. Eine zur gleichen Zeit erschienene weit größere Studie von Stadtmauer et al. mit 553 Patientinnen fand keine Vorteile der HDCT gegenüber konventionellen Chemotherapien. Die Ergebnisse der Bezwoda-Studie wurden 1999 bei einem Treffen der „American Society for Clinical Oncology“ (ASCO) in Atlanta vorgestellt. Nach einer Überprüfung der Studie sollte eine große randomisierte Studie zur Bestätigung der Ergebnisse Bezwodas folgen. Im Januar 2000 wurde die Studie Bezwodas wegen Unstimmigkeiten im Setting und verfälschten Daten als ungültig erklärt. Dies führte zu einem großen Rückschritt in der Erforschung der HDCT beim Mammakarzinom. In Anbetracht der gefälschten Studie, sowie negativen Studien, wie die Stadtmauers, wurden mehrere Hochdosisstudien vorzeitig abgebrochen, die Behandlungen mit HDCT gingen stark zurück.

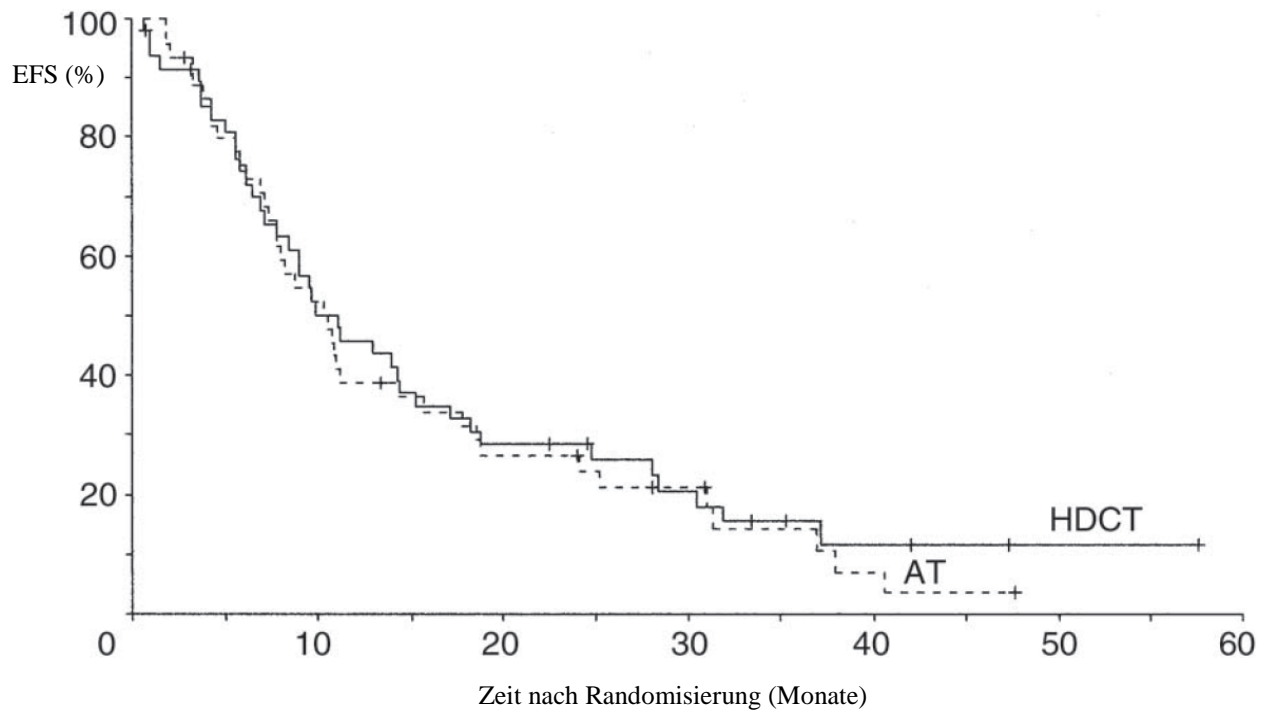
Beim Treffen der ASCO 2001 stellten Crump et al. die Ergebnisse seiner Phase-III-Studie vor. In dieser Studie erhielten randomisiert 219 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom nach vier Zyklen einer SDCT 2-4 weitere Zyklen dieser SCDT oder 1-2 Zyklen gefolgt von einer HDCT (Cyclophosphamid 6g/m², Mitoxantron 70 mg/m², Carboplatin 1800 mg/m²). Während die Patientinnen mit HDCT ein signifikant verbessertes rezidivfreies Überleben aufwiesen, stellten sich keine Unterschiede im 3-Jahres-Überleben heraus. Ein Jahr später zeigten Schmitt et al in einer vergleichenden Studie, in der 92 Patientinnen entweder 6-9 Zyklen einer SDCT mit Doxorubicin und Paclitaxel oder 2 Zyklen einer HDCT (Cyclophosphamid 4,4g/m², Mitoxantron 45 mg/m², Etoposid 2,5 g/m²) erhielten, ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben in der HDCT-Gruppe [Tartarone et al., 2003].

Tartarone et al. hat in seinem Überblick zur HDCT ein Für und Wider der Anwendung der HDCT beim metastasierten Brustkrebs vorgestellt:

Für	Wider
DFS verbessert bei HDCT in 6/7 randomisierten Studien (DFS: Rezidivfreies Überleben)	Kein erwiesener Überlebensvorteil ggü. SDCT (Bezwoda- Studie unberücksichtigt)
Akzeptable HDCT-assozierte Morbidität und Mortalität	Verfahren nur sicher in qualifizierten Zentren anwendbar
Kurze intensive Behandlung anstatt vieler CT-Zyklen	Höhere Kosten, Morbidität, Mortalität
HDCT als Basis für neue Behandlungsschemata	Priorität neuer Therapieansätze

Eine der neuesten Studien von 2005 zum Vergleich von HDCT und SDCT beim metastasierten Mammakarzinom ist die von Schmid et al. Erfasst wurden 93 Patientinnen in den Jahren 1998 bis 2002. Die SDCT bestand aus maximal 6 Zyklen Doxorubicin (60 mg/m²) und Paclitaxel (200 mg/m²). Patientinnen mit partiellem Ansprechen erhielten weitere 3 Zyklen Paclitaxel (200 mg/m²). In der HDCT-Gruppe wurden Mitoxantron (45 mg/m²),

Cyclophosphamid ($2,4 \text{ g/m}^2$, doppelte Dosis im 2. Zyklus), Etoposid ($2,5 \text{ g/m}^2$) verabreicht. Leider ergaben die verschiedenen Therapieformen keine signifikanten Unterschiede, was das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben angeht, wie Abb. 1.12 und 1.13



zeigen.

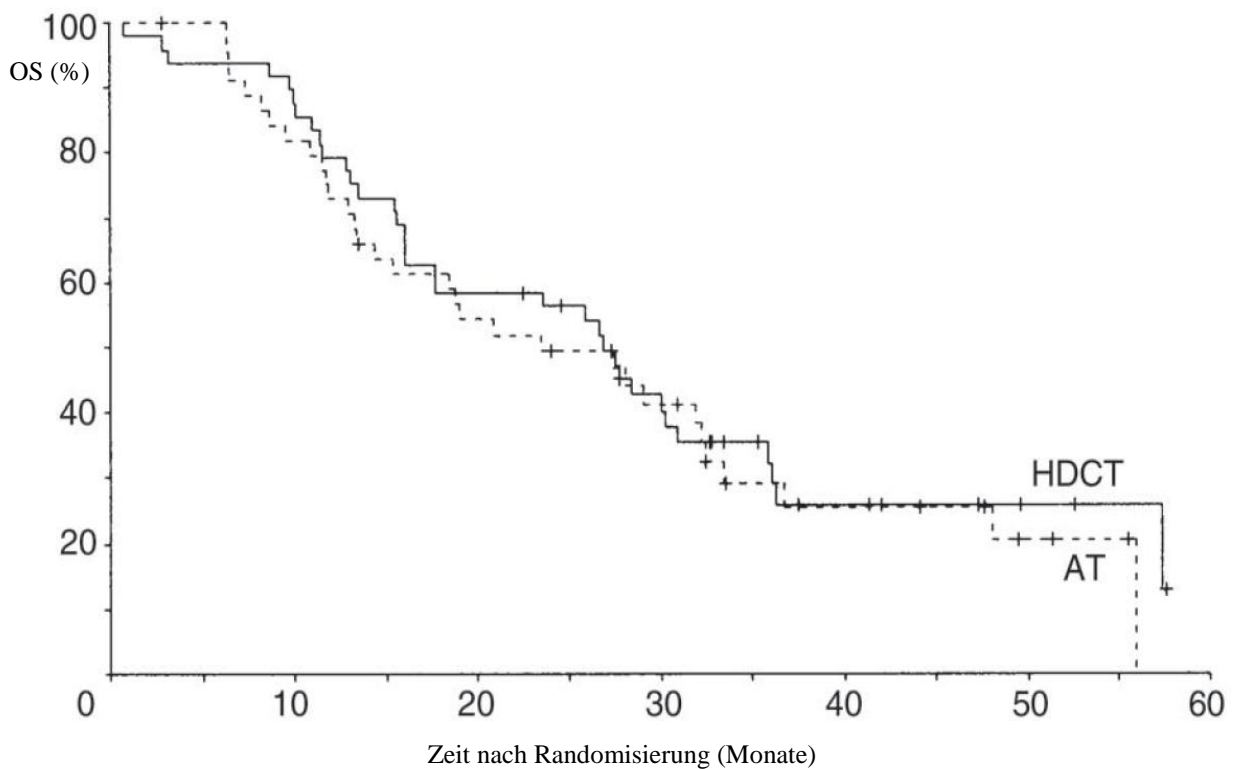


Abb. 1.13: Ereignisfreies Überleben (EFS) und Gesamtüberleben (OS) [Schmid et al., 2005]

Die Frage, ob und in welchen Fällen dosisintensivierte oder HDCT die Behandlungsergebnisse beim Mammakarzinom verbessern könnten, ist also noch immer nicht abschließend geklärt. Insgesamt gilt zum gegenwärtigen Zeitpunkt, dass die HDCT sowohl in der adjuvanten als auch der metastasierten Situation ein vielversprechendes Konzept darstellt, aber bisher nicht als Standardtherapie etabliert werden konnte. Es ist also weiterhin Aufgabe der Medizin, Kriterien für ein Patientengut zu finden, das eindeutig von der HDCT profitiert.

2 Material

2.1 Laborgeräte

DNA-Isolierung MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue) (Roche, Mannheim)
MagNA Pure LC Instrument (Roche, Mannheim)
Lichtmikroskop HM-Lux 3 (Leitz, Wetzlar)
Schlittenmikrotom Microm HM 400 (Heidelberg)
Magnetrührer mit Heizplatte MR 2002 (Heidolph, Nürnberg)
Mikrowelle Whirlpool Jet 900 W M600 (Philipps, Niederlande)
Nexes Immunostainer (Ventana, Tucson, USA)
Pipetten Pipetman (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich)
Pipettenspitzen mit Sterilfilter (BIOZYM, Oldenburg)
Pipettenspitzen Typ B, D, E (Sarstedt, Nümbrecht)
Reaktionsgefäße Genetic Analyzer 0,5 ml (PE Applied Biosystem GmbH, USA)
Reaktionsgefäße Safe Lock 0,5 ml (Eppendorf, Hamburg)
Reaktionsgefäße Safe Lock 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg)
Schnellkochtopf (SKT)
Schüttler VF 2 (Janke & Kunkel, Staufen i. Br.)
Sequencer ABI PRISM™ 310 (Perkin Elmer Applied Biosystem GmbH, USA)
Spannungsgerät Microcomputer Electrophoresis Consort E 455 (BIORAD, München)
Spannungsgerät Power Pac 3000 Power Supply (BIORAD, München)
Speed Vac® SC 100 (Savant)
Sterile Nadeln Microlance 3 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY)
Thermocycler Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg)
Thermocycler Peltier Thermal Cycler PTC-100 MJ Research (Watertown, MS, USA)
Thermocycler Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research (Watertown, MS, USA)
UV-Leuchttisch (Bachofer, Reutlingen)
Waage Analytic A 200 S (Sartorius, Göttingen)
Waage Laboratory L 310 (Sartorius, Göttingen)
Wasserfilteranlage MILLIPORE (Millipore, Eschborn)
Zentrifuge Biofuge A Sepatech (Heraeus, Osterode)
Zentrifuge Biofuge Pico (Heraeus, Osterode)

2.2 Chemikalien, Enzyme und Antikörper

Sämtliche verwendeten Chemikalien wiesen Analysequalität auf.

ABI PRISM 310 10x Buffer mit EDTA (PE Applied Biosystem GmbH, USA)

ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE, USA)

Acrylamid/Bisacrylamid 19:1 (40 %) (BIORAD, München)

Agarose Typ 1-A low EEO (Serva, Heidelberg)

Anti-Goat IgG A4174 (SIGMA, München)

Anti-KPNA2 C-20 (Goat Polyclonal SC6917, Santa Cruz Biotechnology, USA)

Bromphenolblau (SIGMA, München)

Buffer 10x Rx PCR (GIBCO BRL, Eggenstein)

DAB (3,3'-Diaminobenzidin) (ChemMate Detection Kit, DAKO, Glostrup, Denmark)

Desoxyribonukleotidtriphosphate (Boehringer, Mannheim)

DMSO (Dimethylsulfoxid) (MERCK, Darmstadt)

DNA-Molekulargewichtsstandard λ -DNA/Hind-III-Fragmente (Life Technologies)

DNA-Molekulargewichtsstandard 1 kb DNA-Ladder (GIBCO BRL, Eggenstein)

EDTA (Serva, Heidelberg)

Ethanol Rotipuran 99,8 % p.a. (Roth, Karlsruhe)

Ethidiumbromid (MERCK, Darmstadt)

Ficoll Typ 400 (PHARMACIA, Freiburg)

Formamid (SIGMA, München)

HRP (SIGMA, München)

MgCl₂ (GIBCO BRL, Eggenstein)

Avidin-Biotin-Peroxidase (ChemMate Detection Kit, DAKO, Glostrup, Denmark)

Polyethylenglykol 8000 (Aldrich, Steinheim)

Template Suppressor Reagent TSR (PE Applied Biosystem GmbH, USA)

Tris-Puffer (BIORAD, München)

2.3 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung der aufgeführten Puffer und Lösungen wurde stets ultrafiltriertes Wasser aus einer Wasserfiltrationsanlage verwendet.

2.3.1 Allgemeine Lösungen

0,5 M EDTA (pH 8,0):

Ethylendiamintetraacetat 73,1 g

Wasser 800 ml

→ Rühren, mit NaOH pH 8,0 einstellen, mit Wasser auf 1000 ml auffüllen

2.3.2 Lösungen für die HE- Färbung von Paraffinschnitten

Hämatoxylin (0,5%) von Merck (Darmstadt):

Monohydratpulver 0,5 g

Ethanol 10,0 ml

→ Lösen

Wasser 90,0 ml

→ Verdünnen, Reifezeit 5 Wochen

Eosin (0,5%): gebrauchsfertig von Merck (Darmstadt)

2.3.3 Lösung zur Methylenblau- Färbung von Paraffinschnitten

Stammlösung Methylenblau-Lösung (1%) von Sigma (München):

Trihydratpulver 1 g

H₂O 100 ml

→ Arbeitslösung 0,1%

2.3.4 Lösungen für die DNA-Isolation aus Paraffinmaterial

MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue)

Waschpuffer I

Waschpuffer II

Waschpuffer III

Lyse-/Binde- Puffer

Magnetische Glaspartikel (MGPs): Suspension

Elutionspuffer

Gewebe-Lyse-Puffer

Proteinase K

2.3.5 Lösungen für die Amplifikation genomischer DNA mittels Polymerase- Kettenreaktion

Taq-Polymerase: gebrauchsfertig von GIBCO BRL (Eggenstein)

dNTP-Mischung (10 mM):

Stammlösung Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

(100 mM je dNTP)

→ je 10 µl dATP, dTTP, dGTP, dCTP zu 60 µl Wasser geben

*Primer (15 μ M):*Forward-Primer (100 mM) 30 μ lReverse-Primer (100 mM) 30 μ lWasser 140 μ l

→ steril auf Eis pipettieren, aliquotieren, Lagerung bei -20°C

PEP-Primer (15 n): MWG Biotech2.3.6 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese*TAE (50x):*

Tris 242,0 g

Eisessig 57,1 ml

0,5 M EDTA (pH 8,0) 100,0 ml

Wasser ad 1000 ml

→ aliquotieren, autoklavieren, Lagerung bei Raumtemperatur

*Hind-III:*Marker 20 μ lStoppuffer 16,7 μ lWasser 63,3 μ l*Agarosegel (2,5%):*

Agarose 2,5 g

TAE (1x) ad 100 ml

*Stoppuffer:*0,5 M EDTA (pH 8,0) 60 μ l

Bromphenolblau 0,0125 g

Ficoll (Typ 400) 0,75 g

→ in 5 ml Wasser lösen

*Ethidiumbromid-Lösung (0,04%):*Ethidiumbromid 125 μ l

Wasser ad 500 ml

2.3.7 Lösungen für die Fällung und Reinigung von DNA zur Sequenzierung*PEG-Mix:*

PEG 8000 26,2 g

Natriumacetat (3 M, pH 5,2) 20 ml

Magnesiumchlorid (1 M) 660 µl

Wasser ad 1000 ml

Ethanol (70%):

Ethanol abs. 70 ml

Wasser 30 ml

→ immer frisch herstellen

2.3.8 Ansätze für die Sequenzreaktion

ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit:

A-Dye Terminator mit Dichloro [R6G]

C-Dye Terminator mit Dichloro [ROX]

G-Dye Terminator mit Dichloro [R110]

T-Dye Terminator mit Dichloro [TAMRA]

Desoxynukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dITP, dVTP)

AmpliTaq DNA Polymerase mit thermostabiler Pyrophosphatase

Magnesiumchlorid

Tris-HCl Puffer pH 9,0

Oligonukleotid-Mischung:

Outer und Inner Primer 15 µM

Sequenzprimer (f und r getrennt) 3,2 µM

2.3.9 Lösungen für das Sequenzieren am Gerät 310

Performance Optimized Polymer 6 mit TSR: gebrauchsfertig von PE Applied Biosys.

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Buffer mit EDTA (1x):

Buffer 10x 2 ml

Wasser 18 ml

2.3.10 Lösungen für die Anti-Goat Detektion

TRIS- EDTA- Puffer (pH 9,0):

Ethylendiamintetraacetat 73,1 g

Tris 1,21 g

Wasser 800 ml

→ Rühren, mit HCL pH 9,0 einstellen, mit Wasser ad 1000 ml auffüllen

2.4 Verwendete Primer

2.4.1 Primer: Mikrosatellitenanalyse

Repeat-Typ	Name(n) (Markerloкус)	chrom. Lok. ^a (benachbartes Gen)	Repeat-Motiv ^b	Primersequenz(5' to 3')	PCR- Tm ^c	Amplifika- t (bp)
Reines Dinukleotid	1019/1020, MFD257 (D11S988)	11p15.5	(.) ₁₉ (CA) ₂₅	CAG AAA ATA GTT CAG ACC ACC A GGG ACA AGA GAA AGT TGA ACA	58°C	~124 ^d
Trinukleotid	TBP	6q27 (TBP)	(CAG) ₃ (CAA) ₃ (CAG) ₉ CAACAGCAA(CAG) ₁₈	CCC ACA GCC TAT TCA GAA CAC GTT GAC TGC TGA ACG GCT GC	63°C	185-206
Tetranukleotide	UT574 (D18S51)	18q21.3	(.) ₃₇ (GAAA) ₉ GAAN(GAAA) ₃GAAAAA..... (GAAA) ₂ ..GAAA(.) ₁₃₄	GAG CCA TGT TCA TGC CAC TG CAA ACC CGA CTA CCA GCA AC	58°C	~293 ^d
	GATA4H09 (D1S549)	1q32-q42	(.) ₅₆ CTAT.....(CTAT) ₁₁	CAA AGA GGA CAT GTG TTT GTG TAC CAG CAA TGG GTA GTA TGG	58°C	~162 ^d
	GGAA2E02 (D21S1436)	21pter-21qter	(AAGG) ₁₀ GNG(.) ₈₉	AGG AAA GAG AAA GAA AGG AAG G TAT ATG ATG AAA GTA TAT TGG GGG	58°C	172-219

Tab. 2.1: Charakteristika der Mikrosatelliten-Primer [Wild et al., 2000]

^a Chrom. Lok., chromosomale Lokalisation

^b Nichtrepetitive Nukleotide werden als Punkte dargestellt

^c PCR-Tm, PCR-Annealing-Temperatur

^d Länge des Amplifikats laut Gendatenbanken:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), (<http://www.gdb.org>), (<http://www.resgen.com>)

2.4.2 Primer: p53-Sequenzierung

Exon	Reaktion	Name	Tm*	Primersequenz (5' - 3')	Konz. [pmol/μl]	Amplifikat
ganzes Exon	Nested PCR	Outer	p53 5so	54 °C	CAGGAGGTGCTTACACATG	15
			p53 5ao	54 °C	TGAGGAATCAGAGGCCTG	15
		Inner	p53 5s	58 °C	TCACTTGTGCCCTGACTTTC	15
			p53 5a	58 °C	GGAAACCAGCCCTGTCGTC	15
	Sequenzreaktion					270 bp
5	Nested PCR	Outer	p53 5so	54 °C	CAGGAGGTGCTTACACATG	15
			p53 5ao kurz	54 °C	CATGTGCTGTGACTGCTTG	15
		Inner	p53 5s	58 °C	TCACTTGTGCCCTGACTTTC	15
			p53 5a kurz	58 °C	CTTGTAGATGGCCATGGCG	15
	Sequenzreaktion					164 bp
1. Teilstück (5'-Ende)	Nested PCR	Outer	p53 5so	54 °C	CAGGAGGTGCTTACACATG	15
			p53 5ao kurz	54 °C	CATGTGCTGTGACTGCTTG	15
		Inner	p53 5s	58 °C	TCACTTGTGCCCTGACTTTC	15
			p53 5a kurz	58 °C	CTTGTAGATGGCCATGGCG	15
	Sequenzreaktion					164 bp
2. Teilstück (3'-Ende)	Nested PCR	Outer	p53 5so kurz	54 °C	CAACTGGCCAAGACCTGC	15
			p53 5ao	54 °C	TGAGGAATCAGAGGCCTG	15
		Inner	p53 5s kurz	58 °C	AAGACCTGCCCTGTGCAGC	15
			p53 5a	58 °C	GGAAACCAGCCCTGTCGTC	15
	Sequenzreaktion					185 bp
6	Nested PCR	Outer	p53 6so	56 °C	AGACGACAGGGCTGGTTTC	15
			p53 6ao	56 °C	CACATCTCATGGGGTTATAG	15
		Inner	p53 6s	54 °C	TCCCCAGGCCTCTGATTTC	15
			p53 6a	54 °C	TAGGGAGTTCAAATAAGCAG	15
	Sequenzreaktion					260 bp
7	Nested PCR	Outer	p53 7so	56 °C	AAAGGCCTCCCCTGCTTG	15
			p53 7ao	56 °C	AGTATGGAAGAAATCGGTAAG	15
		Inner	p53 7s	60 °C	GCCTCCCCTGCTTGCCAC	15
			p53 7a	60 °C	GTGAGAGGCAAGCAGAGGC	15
	Sequenzreaktion					245 bp
8	Nested PCR	Outer	P53 8so	54 °C	AAATGGACAGGTAGACCTG	15
			P53 8ao	54 °C	GAATCTGAGGCATAACTGC	15
		Inner	P53 8s	58 °C	TAGACCTGATTTCTTACTGC	15
			P53 8a	58 °C	GCATAACTGCACCTTGGTC	15
	Sequenzreaktion					200 bp
9	Nested PCR	Outer	P53 9so	54 °C	GAGGAGACCAAGGGTGC	15
			P53 9ao	54 °C	TTGAGTGTAGACTGGAAAC	15
		Inner	P53 9s	58 °C	GGGTGCAGTTATGCCTCAG	15
			P53 9a	58 °C	AGACTGGAACTTCCACTTG	15
	Sequenzreaktion					175 bp

* Tm: Annealing-Temperatur

Tab. 2.2: Primer zur Sequenzierung des p53-Gens

Exon	Name	Ann.	Sequenz (5' → 3')	bp	Amplifikat (bp)
5	p53 5so	58°C	CAGGAGGTGCTTACACATG	19	270
5	p53 5ao	58°C	TGAGGAATCAGAGGCCTG	18	
5	p53 5s	58°C	TCACTTGTGCCCTGACTTTC	20	
5	p53 5a	58°C	GGAAACCAGCCCTGTCGTC	19	
5	p53 5qs	48°C	CCTGACTTTCAACTCTG	17	260
5	p53 5qa	48°C	AGCCCTGTCTCTCTC	16	
6	p53 6so	56°C	AGACGACAGGGCTGGTTTC	19	
6	p53 6ao	56°C	CACATCTCATGGGGTTATAG	20	
6	p53 6s	54°C	TCCCCAGGCCTCTGATTC	18	245
6	p53 6a	54°C	TAGGGAGGTCAAATAAGCAG	20	
6	p53 6qs	50°C	CCTCTGATTCTCACTG	17	
6	p53 6qa	50°C	CACTGACAACCACCCTT	17	
7	p53 7so	56°C	AAAGGCCTCCCCTGCTTG	18	200
7	p53 7ao	56°C	AGTATGGAAGAAATCGGTAAG	21	
7	p53 7s	60°C	GCCTCCCCTGCTTGCCAC	18	
7	p53 7a	60°C	GTCAGAGGCAAGCAGAGGC	19	
7	p53 7qs	48°C	TGCTTGCCACAGGTCT	16	175
7	p53 7qa	48°C	CAGCAGGCCAGTGTGC	16	
8	p53 8so	54°C	AAATGGACAGGTAGACCTG	19	
8	p53 8ao	54°C	GAATCTGAGGCATAACTGC	19	
8	p53 8s	58°C	TAGACCTGATTTCCTTACTGC	21	175
8	p53 8a	58°C	GCATAACTGCACCCTTGGTC	20	
8	p53 8qs	50°C	TCCTTACTGCCTCTTGC	17	
8	p53 8qa	50°C	CCCTTGGTCTCCTCCA	16	
9	p53 9so	54°C	GAGGAGACCAAGGGTGC	17	175
9	p53 9ao	54°C	TTGAGTGTTAGACTGGAAAC	20	
9	p53 9s	58°C	GGGTGCAGTTATGCCTCAG	19	
9	p53 9a	58°C	AGACTGGAACTTTCCACTTG	21	
9	p53 9qs	48°C	TTATGCCTCAGATTCCT	18	175
9	p53 9qa	48°C	CTTCCACTTGATAAGAG	18	

Tab. 2.3: Primer für die p53-Sequenzierung (Ann. = Annealing-Temperatur)

so = outer Primer, sense

ao = outer Primer, antisense

s = inner Primer, sense

a = inner Primer, antisense

qs = Sequenz-Primer, sense

qa = Sequenz-Primer, antisense

bp = Basenpaare)

3 Methoden

3.1 *DNA-Isolierung aus Paraffinmaterial*

Die gewonnenen Gewebe wurden in Formalin fixiert und im Paraffinblock eingebettet zur Verfügung gestellt. Für die molekulargenetischen Untersuchungen musste die DNA aus dem entparaffinierten Gewebe gewonnen werden, indem umgebende Zellelemente und strukturgebende Proteine entfernt wurden. Die DNA-Isolierung wird nun anhand der einzelnen Schritte vorgestellt.

3.1.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Aus einem Paraffinblock wurden mittels Schlittenmikrotom jeweils fünf 3-5 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt. Die Schnitte wurden dann nach einem 45°C warmen Wasserbad auf beschriftete und nicht vorbehandelte Objektträger aufgezogen (bei Vorbehandlung würde das Gewebe zu stark haften). Im letzten Schritt wurden die Schnitte dann bei 42-45°C im Brutschrank getrocknet.

3.1.2 Entparaffinieren der Gewebeschnitte

Die getrockneten Schnitte wurden zunächst aufrecht für 20 min. bei 72°C inkubiert, damit das Paraffin schmelzen und ablaufen konnte. Danach wurden sie nach folgendem Muster durch eine absteigende Alkoholreihe gezogen:

1. 10 min. Xylol
2. 10 min. Xylol
3. Dehydrierung in absteigender Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 96%, 70%) je 5 min.

Während die zur Mikrodisektion bestimmten Schnitte in 70%igem Alkohol aufbewahrt wurden, wurde pro Gewebeblock ein HE-Schnitt angefertigt:

3.1.3 Anfertigung eines HE-Schnittpräparates

Die HE-Färbung diente zur histologischen Beurteilung des Schnittes und wurde als Referenz bei der Mikrodisektion verwendet. Das Präparat wurde zur Abgrenzung von Tumor- und Normalgewebe angezeichnet. Zellkerne erschienen bei dieser Färbung blau (Hämatoxylin), das Zytoplasma trat dabei rot hervor (Eosin).

Gefärbt wurde nach folgendem Schema:

1. 1 min. in dest. Wasser
2. 5 min. in Hämatoxylin
3. 15 min. Bläuen in Leitungswasser (warm)
4. einige Sekunden in Eosin

5. Spülen in Leitungswasser (kalt, 2x)
6. Aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 96%, 100%, 100%) je 5 min.
7. Xylol, 2x 10 min.
8. Eindeckeln mit Entellan und Deckglas

3.1.4 Mikrodissektion

Die manuelle Mikrodissektionstechnik diente dazu, im histologischen Schnitt Normalgewebe und Tumorgewebe zu trennen. Als Muster zur Abgrenzung der Gewebeareale diente der zuvor mit Folienstift angezeichnete HE-Schnitt. Die Anzeichnung erfolgte unter einem Lichtmikroskop. Die in 70%igem Alkohol aufbewahrten Schnitte wurden zunächst 1 min. in dest. Wasser getaucht, dann für eine weitere Minute in 0,2%ige Methylenlösung gebracht und schließlich wieder in dest. Wasser gegeben. Im nun blau gefärbten Gewebe wurde unter einem Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung zunächst das Normalgewebe mittels steriler Kanüle durch vorsichtiges Abkratzen separiert und dann in ein beschriftetes 1,5 ml-Eppendorf-Cup mit 180 µl Puffer 1 (Gewebe-Lysepuffer) gebracht. Ebenso wurde mit dem Tumorgewebe verfahren. Zur weiteren Verarbeitung sollten hier jeweils mindestens 500 Zellen gewonnen werden.

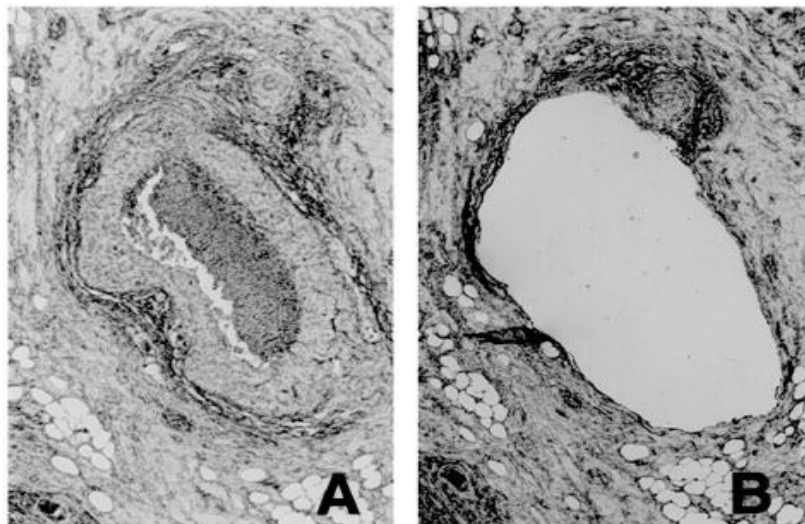


Abb. 3.1: Mikrodissektion eines duktales Carcinoma in situ

3.1.5 Proteinase-K-Verdau und Isolierung der DNA

Bevor nun die zu analysierende DNA isoliert werden konnte, musste ein Verdau des gesamten Zellmaterials erfolgen. Der Proteinase-K-Verdau ist Teil des zur DNA-Isolierung verwendeten MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue). Zu dem im Gewebe-Lysepuffer befindlichen Zellmaterial wurden 20 µl gebrauchsfertige Proteinase K gegeben. Die erhaltene Suspension wurde gut durchmischt, abzentrifugiert und über Nacht bei 55°C unter leichtem

Schütteln im Thermoblock inkubiert. Ergebnis des Verdaus war eine homogene, transparente Lösung.

Die DNA-Isolierung erfolgte nun mit Hilfe des MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue).

Isoliert wurde nach Auftrag auf die Probenplatte vollautomatisch, wobei sieben Schritte durchlaufen wurden:

1. Denaturierung der Proteine unter Zugabe von Lyse-/ Bindepuffer und somit Freisetzung der DNA
2. Zugabe von Proteinase K → Beginn des Verdaus der zellulären Proteine
3. Bindung der DNA an die Silikonoberfläche magnetischer Glaspartikel (MGP)
4. Trennung der MGPs mit gebundener DNA magnetisch vom lysierten Probenmaterial
5. Aufreinigung der DNA durch mehrmaliges Waschen der MGPs mit Waschpuffer
6. Trennung der MGPs mit gebundener DANN vom Waschpuffer
7. Elution der gereinigten DNA bei 70°C in die Vertiefungen der Platte

Die gereinigte DNA wurde dann in 100 µl H₂O gelöst im beschrifteten Cup bei 4°C aufbewahrt.

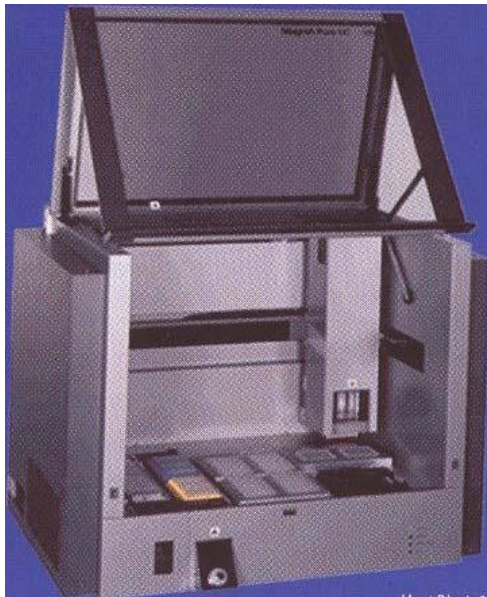


Abb. 3.2: MagNa Pure LC Instrument
(Roche Applied Science)

3.2 Techniken für die Mikrosatelliten-Analyse (MA) und die LOH-Analyse

3.2.1 In-vitro-DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Diese Methode diente zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. Hierzu wurden definierte Primer verwendet, die jeweils an der 3'-Seite des Matrixstranges der gewünschten Zielsequenz binden, eine Polymerase, sowie die vier verschiedenen Desoxyribonukleosidtriphosphate. Die PCR ist seit ihrer Einführung durch Mullis [Mullis et al., 1990] eines der wichtigsten Verfahren in der Molekularbiologie. Eine PCR besteht aus n Zyklen. Im Folgenden werden die drei Schritte eines Zyklus kurz vorgestellt:

1. **Denaturierung:** Strangtrennung der Ausgangs-DNA durch kurzes Erhitzen (1 min.) auf 94°C
2. **Annealing:** Hybridisierung der Primer bei der sog. Annealing-Temperatur (primerspezifisch zwischen 50°C und 70°C)
3. **Elongation:** Verlängerung der Primer bei 72°C durch Anheften der komplementären Nukleotide an das freie 3'-OH- Ende und damit in Richtung der Zielsequenz.

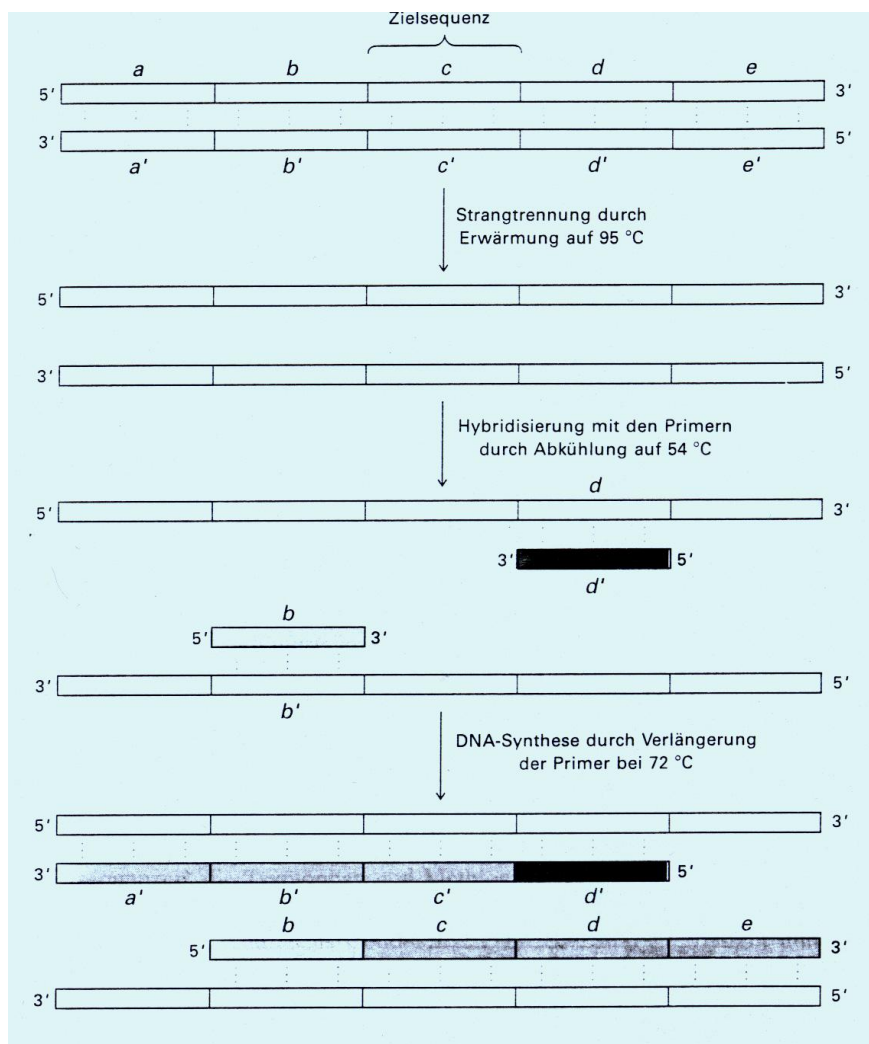


Abb. 3.3: Prinzip der PCR-Reaktion (Stryer, 1996)

Polymerase war die sog. Taq-Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wird. Diese ist hitzestabil, so dass sie den Denaturierungsschritt übersteht und nicht nach jedem Zyklus neu hinzugefügt werden muss. Ihr Aktivitätsoptimum liegt bei 72°C.

Ein Wiederanlagern von zwei komplementären Strängen der Ausgangs-DNA während der Hybridisierung wurde durch die hohe Primerkonzentration verhindert. Die gewünschte DNA-Sequenz wurde somit exponentiell vermehrt, im Idealfall nach n Runden auf das 2^n -fache, in der Praxis beträgt die Vermehrung nach 20-30 Runden 10^6 bzw. 10^7 [Stryer, 1996].

3.2.2 Anwendung der PCR für die LOH-und MSI-Analyse

Die oben beschriebene PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit dazu verwendet, Mikrosatelliten-DNA zu amplifizieren und auf Allelverluste (LOH) sowie auf Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI) zu untersuchen.

Für die Mikrosatellitenanalyse (MA) wurden Primer ausgewählt, wie sie in der Studie von Wild et al., 2000, zur MA beim Mammakarzinom verwendet wurden. Die Primer flankierten dabei Mikrosatelliten-DNA (nicht-codierende DNA-Sequenzen, welche bestimmte Mono-, Di-, Tri- oder Tetranukleotid-Motive in vielfacher Wiederholung enthalten). Der Vorteil der Mikrosatelliten-DNA liegt darin, dass sie interindividuell ausgesprochen polymorph ist, so dass viele unterschiedlich lange Allele in einer Population existieren und die Wahrscheinlichkeit, dass eine Person zwei verschiedene Allele für diesen Chromosomenlocus besitzt (heterozygot ist), hoch ist. Dies aber ist wiederum Voraussetzung für die LOH-Analyse, da nur heterozygote Patienten auf den Verlust eines Allels hin beurteilt werden können. Meist ist das Mikrosatelliten-Amplifikat selbst nichtcodierend, so dass der Verlust eines Allels (Deletion) primär keine Auswirkungen hat. In manchen Fällen allerdings handelt es sich um codierende Abschnitte, deren Verlust zu Folgen führen kann (Codierung einer anderen Aminosäure, Veränderung des Proteins). Durch Wahl der Mikrosatelliten-Loci in der Nähe bekannter oder mutmaßlicher Tumor-Suppressorgene ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass im Falle einer Deletion auch das benachbarte Tumor-Suppressorgen verloren ging. Zudem konnten durch die kombinierte Anwendung von mehreren Primern für unterschiedliche Loci Rückschlüsse auf dazwischenliegende Tumor-Suppressorgen-Loci bzw. auf den Verlust ganzer Chromosomen(arme) gezogen werden. Die verwendeten Primer sowie die jeweils erforderlichen Annealing-Temperaturen können der Tab. 2.4.1 entnommen werden.

Sämtliche Reagenzien für die PCR wurden auf Eis pipettiert, um die Haltbarkeit der Substanzen zu erhöhen und unspezifische Reaktionen zu minimieren. Die Zusammensetzung des Standard-PCR-Ansatzes lautet wie folgt:

Tab. 3.1: Master-Mix für Standard-PCR-Reaktion (Endkonz. = Endkonzentration im Master-Mix)

	RK.-Mix (Master-Mix)	für 1	
	V [μ l]	Endkonzentration	Stammlösung
Aqua dest.	19,6		
10 x Reaktions- Puffer	3,0	1 x	10 x
DMSO	1,5	5%	100%
MgCl ₂ (Gibco)	1,8	1,5 mM	25 mM
DNTPs	0,6	0,2 mM	10 mM
Primer	0,4	0,3 μ M	25 μ M
Taq (Gibco)	0,1	0,02 U/ μ l	5 U/ μ l
Total	27		
27 μl PCR-Mix + 3 μl DNA			

Nachdem sämtliche Zutaten für den Master-Plex pipettiert waren, wurden sie auf dem Schüttler gut durchmischt und auf die Reaktionsgefäße verteilt. Anschließend wurde die aus der DNA-Isolierung erhaltene Template-DNA (3 μ l) zum Master-Mix pipettiert. Im Einzelfall wurde auch mehr DNA verwendet, wobei dann dementsprechend weniger H₂O eingesetzt wurde. Nachdem das Gemisch noch einmal kurz geschüttelt und abzentrifugiert wurde, kamen die Proben in den auf 94 °C vorgeheizten Thermocycler (mit geheiztem Deckel), um eine unspezifische Reaktion während des Aufheizens zu verhindern. Das entsprechende PCR-Programm wurde gestartet (Tab 3.2).

Tab 3.2: Amplifikationsbedingungen (AT = Annealing-Temperatur des Primers)

Schritt	Operation	
1	94 °C	3 min
2	1 °C/sec	Ramp to 94 °C
3	94 °C	1 min
4	1 °C/sec	Ramp to AT
5	T _m	1 min
6	1 °C/sec	Ramp to 72 °C
7	72 °C	1 min
8	Go to 2	34 times
9	72 °C	8-10 min
10	4 °C	Forever
11	End	

Da der Versuch, vier Primer als Multi-Mix in einer PCR laufen zu lassen, nicht die gewünschten Ergebnisse erbrachte, wurde die DNA in vier Ansätzen mit jeweils einem Primer amplifiziert. Jeweils 5 μ l der PCR-Produkte eines Templates, aber unterschiedlicher Primer wurden in ein Cup pipettiert, dann geschüttelt und abzentrifugiert (sog. „Poolen“). Die erhaltenen gepoolten PCR-Produkte wurden im Anschluss an die Reaktion bis zur Fragmentanalyse im Kühlschrank aufbewahrt.

3.2.3 Fragmentanalyse (FA)

Zur Darstellung der LOH bzw. MSI wurde das PCR-Produkt zur Fragmentanalyse nach einem Belegungsplan auf eine 96-well-Probenplatte pipettiert. Die Analyse erfolgte dann automatisch mit dem ABI PRISM™ 310. Nach der Beendigung der FA erfolgte die Auswertung der Rohdaten auf einem Macintosh-Rechner mit der Software von ABI-PRISM (Version 3.0). Anschließend wurde ein farbiges Chromatogramm erstellt, auf dem der Name der Probe, die Allelausprägungen als Bandenmuster (Fluoreszenzpeaks) sowie weitere Daten zum Analysevorgang erschienen.

Zur Durchführung der FA diente folgender Ansatz:

Tab. 3.3: Ansatz für die Sequenzreaktion

Substanz	Volumen
Hidi	12 µl
Standard	0,5 µl
DNA bei gepooltem PCR- Produkt:	1 µl 1 µl / Primer
Gesamt	ad 20 µl

(Einzelheiten zur Funktionsweise des Gerätes s. Abschnitt 3.3)

3.2.4 Interpretation der Bandenmuster

Nach der FA konnte der MSI- bzw. LOH-Status der jeweiligen Tumorprobe erhoben werden. Um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, wurden sämtliche Befunde in einem zweiten Versuchsansatz verifiziert. Die Auswertungen wurden von vier Untersuchern (Prof. Dr. med. A. Hartmann, PD Dr. rer. nat. W. Dietmaier, Dr. med. P. Wild, R. Meiler) unabhängig voneinander ausgewertet:

Durch die PCR-Reaktion wurden primerspezifische Sequenzen eines bestimmten Chromosomenabschnitts amplifiziert und erschienen in der ABI-PRISM-Auswertung als Peaks. Diese Peaks stellten die Allele des untersuchten Chromosomenabschnitts dar. Zeigten die Allele in Tumor- und Normalgewebe das identische Peak-Muster, so wurde die Probe als **mikrosatellitenstabil (MSS)** gewertet.

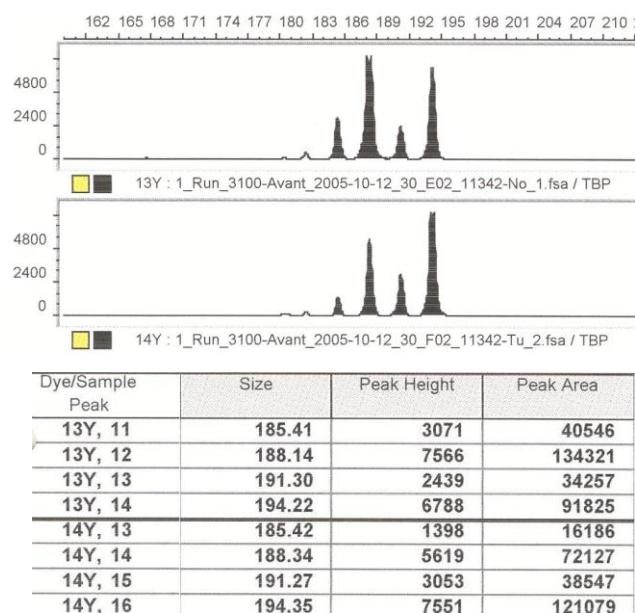


Abb. 3.4: Auswertung mikrosatellitenstabiler (MSS) Tumor

Eine im Verhältnis zum Normalgewebe um mindestens 50% verminderte Signalintensität eines Allels im Tumorgewebe wurde als Heterozygotenverlust bzw. **Loss of Heterozygosity (LOH)** definiert.

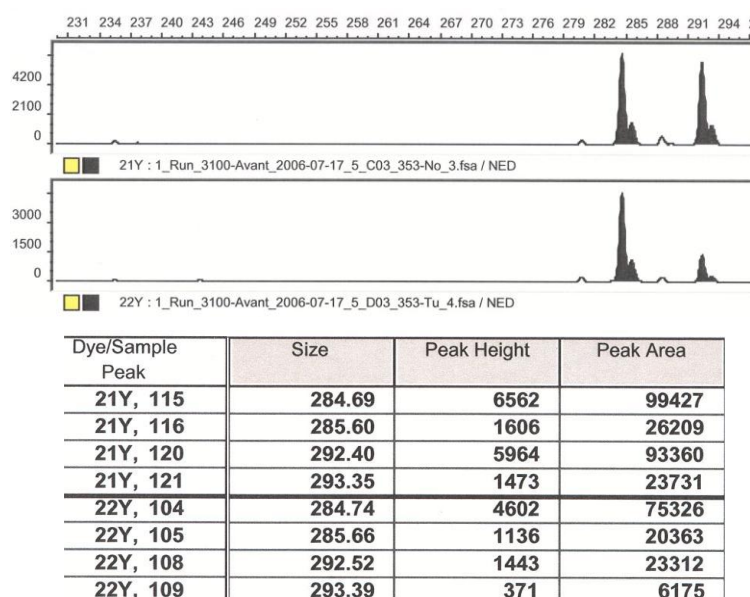


Abb. 3.5: Auswertung LOH

Als LOH (Loss of Heterozygosity) bezeichnet man den Verlust eines Allels. Gemäß der „Two-Hit-Hypothese“ von Knudson (1985) geht ein Allel verloren (zB. durch LOH) und der zweite Hit (zB. eine Mutation) führt dann zum Ausfall der Funktion des Gens. LOH bedeutet jedoch eigentlich eine allelische Imbalance im weitesten Sinne, da das alterierte erste Allel durch das zweite Allel nicht mehr ausgeglichen werden kann. Der Begriff LOH umfasst daher alle Mechanismen, die zu einem Funktionsverlust des zweiten Allels führen: Deletion, fehler-

hafte mitotische Rekombination, nichtdisjunkionaler Chromosomenverlust, Genkonversion, Punktmutation oder epigenetische Inaktivierung von Allelen [Tischfield, 1997].

Trat im Tumor ein zusätzlicher Peak auf, wurde dies als **mikrosatelliteninstabil (MSI)** interpretiert.

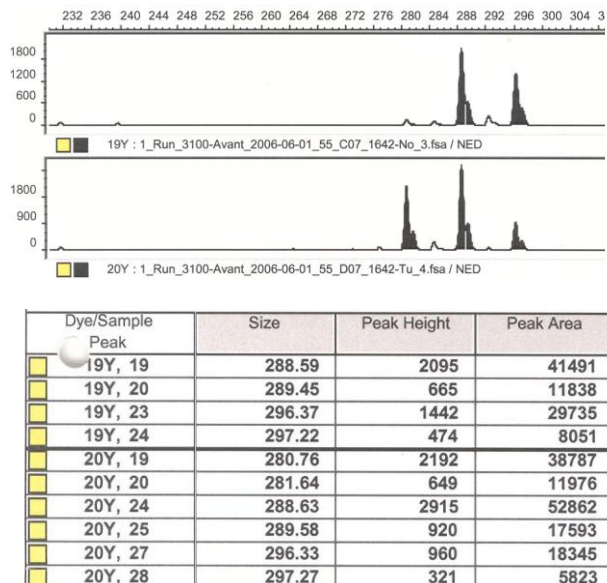


Abb. 3.6: Auswertung mikrosatelliteninstabiler (MSI) Tumor

Aufgrund des Fehlens von Mismatch-Repair-Proteinen können Replikationsfehler in hoch-repetitiven DNA-Abschnitten nicht korrigiert werden. Dadurch ändert sich die Länge der Mikrosatelliten-DNA (meist Verkürzung) in den betroffenen Zellen.

3.3 Sequenzierung des p53-Gens

Der zweite Teil dieser Arbeit bestand in der Sequenzierung des Tumor-Suppressor-Gens p53. Die Untersuchungen beschränkten sich auf die Exons 5-9 des aus 11 Exons bestehenden Gens, weil 85% aller Mutationen in diesen Exons gefunden werden [Hartmann et al., 1995].

3.3.1 Sequenzreaktion nach Sanger

Das Prinzip der Reaktion geht auf die von Sanger entwickelte Didesoxymethode zurück [Stryer, 1996] und beruht darauf, dass ein Gemisch aus den vier Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) und vier speziellen Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) verwendet wird. Die Reaktionen in Sense- und Antisense-Richtung erfolgen in getrennten Ansätzen. Der Primer bindet an die komplementäre Sequenz des DNA-Fragmentes. Wie bei der PCR werden durch eine Taq-Polymerase Nukleotide an das freie 3'-OH-Ende geheftet. Somit wird ein zum Template-Strang komplementärer Strang synthetisiert. In zufälliger Weise werden auch die Didesoxyformen von A, T, G und C an den entsprechenden Stellen eingebaut. Dies führt jedoch zum Abbruch der Kettenverlängerung, weil die ddNTPs kein

freies 3'-OH-Ende besitzen. Resultat der Sequenzreaktion, die im Übrigen die DNA aufgrund des fehlenden gegenläufigen Primers linear und nicht exponentiell amplifiziert, sind DNA-Stränge unterschiedlichster Länge, welche alle am 3'-Ende ein ddNTP aufweisen. Diese ddNTPs sind von ABI PRISM als Big Dye Terminatoren konzipiert.

Die DNA-Fragmente wurden nach ihrer Länge im Elektrophorese-Gel des Sequencers aufgetrennt. Mit einem Argon-Ionen-Laser werden die Fragmente nun abgetastet. Dabei absorbiert der Donor die Laser-Energie und gibt sie über das Linker-Molekül fast vollständig an den Akzeptor weiter. Dieser emittiert die Energie wieder, wobei sich die Emissionsspektren der vier Basen A, T, G und C durch Verwendung unterschiedlicher Dichloro-Rhodamine unterscheiden. Somit kann bei jeder Oligonukleotid-Fraktion einer definierten Länge durch Auswertung der emittierten Signale die Base am 3'-Ende identifiziert werden. Durch Zusammenfügen der Informationen aller Oligonukleotid-Fragmente erhält man die komplette Sequenz des untersuchten DNA-Abschnitts. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte erläutert:

3.3.2 Amplifikation der DNA durch Nested-PCR

Zunächst mussten die Exons in ausreichender Menge für die folgende Sequenzreaktion amplifiziert werden. Als Technik hierfür wurde die Nested-PCR gewählt. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, einer herkömmlichen PCR eine zweite PCR nachzuschalten, wobei in dieser als Template DNA die PCR-Produkte der ersten Reaktion eingesetzt werden. Die Primer der zweiten Reaktion werden dabei so gewählt, dass sie innerhalb der Zielsequenz der ersten Reaktion binden. Auf diese Weise werden die Ausbeute an Amplifikat-DNA und die Spezifität der Reaktion wesentlich erhöht. PCR-Ansatz und -Programm entsprachen der in Kapitel 3.2.1.2 aufgeführten Standard-PCR mit einigen Modifikationen. So wurden in der ersten Runde 2 µl Template-DNA und in der zweiten PCR 5 µl des PCR-Produkts der ersten Reaktion als Template-DNA eingesetzt. An Taq-Polymerase wurde die doppelte Menge eingesetzt (0,2 µl), an Primer jeweils 1 µl einer 15 µM Stammlösung. Die erhaltenen PCR-Produkte konnten bis zur Durchführung der PEG-Fällung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden, für eine längere Lagerung wurden sie bei -20°C eingefroren.

3.3.3 PEG-Fällung der PCR-Produkte

Um in der nachfolgenden Sequenzreaktion optimale Ergebnisse zu erzielen, mussten die PCR-Produkte zunächst von freien dNTPs und Primern gereinigt werden. Hierzu diente die Fällung mit Polyethylenglykol (PEG). In dieser Arbeit wurde dabei nach folgendem Protokoll verfahren:

1. 30 µl PCR-Produkt mit 30 µl PEG-Mix vermischen, gut schütteln
2. 20 min. bei Raumtemperatur inkubieren
3. 25 min. bei 13000 rpm zentrifugieren
4. Überstand abziehen, dabei auf Pellet achten
5. 100 µl Ethanol absolut zugeben, nicht mehr schütteln (2x vorsichtig schwenken)
6. 15 min. bei 13000 rpm zentrifugieren
7. sofort Überstand abziehen, dabei auf Pellet achten
8. Proben für ca. 5 min. (Temperatur: Medium) in der Speedvac trocknen
9. Pellet in 20 µl dest. Wasser lösen
10. 10 min. bei 37°C im Thermomixer inkubieren

Die Proben wurden bei –20°C im Gefrierschrank gelagert.

3.3.4 Abschätzung der DNA-Konzentration durch Agarosegel-Elektrophorese (1,25%)

In einem Erlenmeyerkolben wurden 1,25 g Agarose mit 1xTAE auf 100 ml aufgefüllt und in der Mikrowelle bei 1000 W erhitzt, bis eine durchsichtige Lösung ohne größere Schlieren entstand. Das verdampfte Volumen wurde durch destilliertes Wasser wieder aufgefüllt. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, wurde sie in die vorbereitete Gelform gegossen. Zwei Kämme mit jeweils 24 Slots wurden eingesetzt.

Bis zum Aushärten des Gels (ca. 30 min.) wurden die Proben vorbereitet. Jeweils 3 µl PCR-Produkt und 3 µl Stoppuffer wurden zusammenpipettiert, geschüttelt und kurz abzentrifugiert. Nun wurden die Kämme herausgezogen und das Gel horizontal in die Gelkammer gelegt, welche mit 1xTAE als Laufpuffer gefüllt war. Jeweils 6 µl Probenlösung wurden in die Slots pipettiert, als Längenstandard dienten 1,6 µl Hind-III-Marker.

Die Laufzeit betrug 30 min. bei 110 V. Anschließend wurden die Gele 10 min. lang in einer 0,04% Ethidiumbromidlösung, einem Fluoreszenzfarbstoff, der mit der DNA interkaliert, gefärbt. Nach einem kurzen Wasserbad wurde das Gel unverzüglich auf einen UV-Leuchtschirm gelegt und mit Belichtungszeiten von 1-2 Sekunden fotografiert, wodurch die DNA in Form weißer Banden sichtbar wurde (Abb. 19).

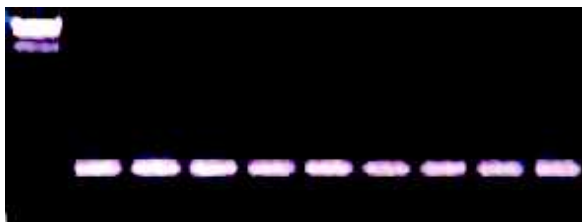


Abb. 3.7: Agarose-Gel-Foto mit Marker (links) und den amplifizierten Proben, welche unter UV-Licht als weiße Banden sichtbar werden.

3.3.5 Sequenzreaktion

Tab. 3.4: Ansatz für die Sequenz- Reaktion

Substanz	Volumen
Primer (3,2 pmol/μl)	2 μl
Premix [ddNTPs fluoreszenzmarkiert, dNTPs, AmpliTaq [®] DNA Polymerase FS, Inkubationspuffer (PE Applied Biosystems)]	5 μl
DNA (Volumen abh. vom Agarosegel, siehe Abb. 3.18)	1-5 μl
H ₂ O dest.	ad 20 μl

Tab. 3.5: Programm für die Sequenz- Reaktion (AT=Annealing- Temperatur des Primers)

Schritt	Operation
1	96°C, 15 s
2	1°C/s auf AT
3	AT, 15 s
4	1°C/s auf 60°C
5	60°C, 4 min
6	gehe zu 1, 24x
7	4°C für immer

3.3.6 Ethanolfällung der Reaktionsprodukte

Die Produkte mussten nun von freien Primern, dNTPs, ddNTPs und verschiedenen Salzen gereinigt werden. Diese Verunreinigungen würden die Erfassung der Fluoreszenzsignale am Sequenziergerät stören. Die Ethanolfällung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. 80 μl dest. Wasser
2. 10 μl Natriumacetat 3 M, pH 4,6
3. 250 μl Ethanol 100 %
4. 20 μl PCR- Produkt
5. 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
6. gut mischen
7. 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren
8. Überstand abkippen
9. 250 μl Ethanol 70%, nicht mehr schütteln
10. 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
11. Überstand mit doppelter Spitze abziehen, auf Pellet achten
12. 2-5 min in Speedvac trocknen (Temperatur: Medium)
13. Pellet in 12 μl Hidi lösen (vortexen und abzentrifugieren), falls keine Weiterverarbeitung erfolgt, DNA bei -20°C einfrieren

3.3.7 Elektrophorese und Detektion der Fluoreszenzsignale

Beim ABI PRISM 310 Genetic Analyzer kommt das Prinzip der Kapillarelektrophorese zur Anwendung. Das Gerät saugt für jede Probe separat ein gebrauchsfertiges Polymer über eine Kapillare an. Neben dem Polymer wurden noch Analyzer Buffer (1x) und destilliertes Wasser benötigt.

Die Proben wurden nach einem Belegungsplan auf eine 96-well-Platte pipettiert. Der Vorgang wurde gestartet. Nach der Beendigung des Sequenziervorgangs erfolgte die Auswertung der Rohdaten auf einem Macintosh-Rechner mit der Software von ABI-PRISM (Version 3.0). Anschließend erfolgte der Ausdruck des farbigen Chromatogramms. Jedes Chromatogramm enthielt den Namen der Probe, die Basensequenz als Buchstabenfolge und als Folge von Fluoreszenzpeaks sowie weitere Daten zum Sequenziervorgang.

3.3.8 Auswertung der Daten

Zur Auswertung wurden die Chromatogramme zunächst auf Fehler überprüft (Vergleich der Peaks mit den darüberstehenden Basen) und im Bedarfsfall korrigiert. Hilfreich war in zweifelhaften Fällen auch ein Vergleich mit der komplementären Sequenz. Anschließend wurde durch Vergleich der Exonsequenz mit der Wildtyp-Sequenz nach Mutationen gesucht. Dabei entsprach die Höhe der Peaks der mutierten Base in etwa derjenigen der Wildtyp-Base (heterozygote Mutation, d.h. ein Allel ist mutiert, das andere unverändert; Abb. 3.8). Im Falle einer hemizygoten Mutation (d.h. ein Allel ist mutiert, das andere deletiert) war nur der Peak der mutierten Base sichtbar (Abb. 3.9).

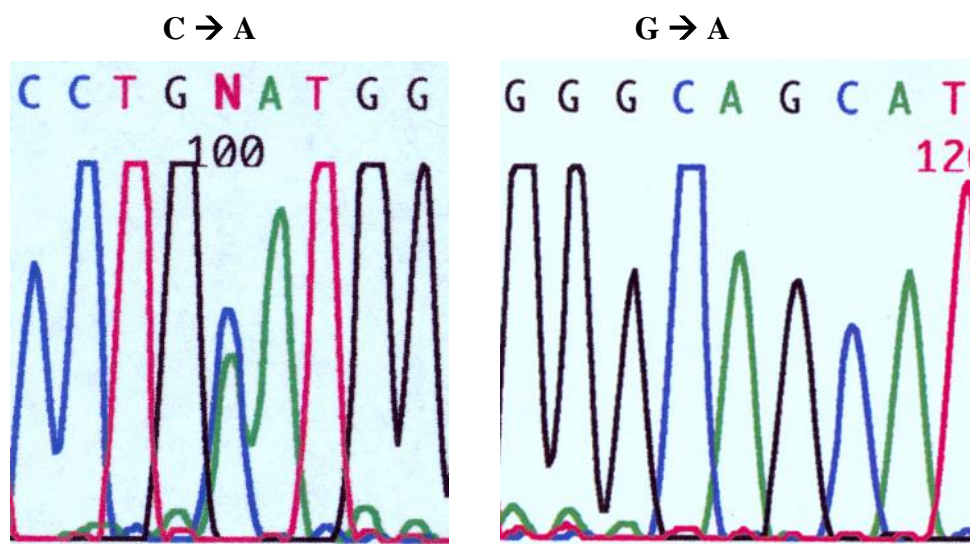


Abb. 3.8: Heterozygote Mutation

Abb. 3.9: Hemizygote Mutation

Aufgrund der Fehlerrate der Taq-Polymerase von 10^{-4} /bp [Dietmaier et al., 1999] mussten alle gefundenen Mutationen durch einen zweiten Sequenziervorgang verifiziert werden, um Arte-

fakte sicher auszuschließen. Mit der Gleichung $F=1-e^{-bfd}$ lässt sich die zu erwartende Fehlerquote berechnen (F = Mutationsfraktion, b = Länge der Zielsequenz, f = Fehlerrate der Taq-Polymerase, d = Anzahl der PCR-Zyklen [Keohavong et al., 1989]). Geht man nun davon aus, dass pro Tumor unter Einbeziehung aller Exons eine Zielsequenz von 700 bp amplifiziert wird, die Zyklenzahl ferner 80 beträgt (2x40 bei der Nested-PCR), so erhält man durch Einsetzen $F=1-e^{-700*0.0001*80} = 99,6\%$. Das heißt, dass praktisch in fast allen Proben ein Fehler zu erwarten gewesen wäre. Rechnet man dies auf die Fehlerrate pro Base um, so kommt man auf 1 Fehler pro 703 Basen. Diese Berechnungen zeigen die Notwendigkeit von Wiederholungsreaktionen zur Bestätigung der erhaltenen Ergebnisse.

3.4 Immunhistochemische Färbung zur KPNA2-Analyse: Anti-Goat Detektion (Sigma)

3.4.1 Entparaffinieren der Gewebeschnitte

Die Gewebeschnitte wurden nach dem unter 3.1.2 beschriebenen Verfahren entparaffiniert.

3.4.2 Schnellkochtopf (SKT)-Vorbehandlung

Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden 5 min. bei 120°C mit Tris-EDTA-Puffer im Schnellkochtopf vorbehandelt und dann in destilliertem Wasser aufbewahrt.

3.4.3 Inkubation der Antikörper

Gewebeschnitte:

1. 5 min. in Peroxidase-Lösung geben
2. 5 min. in Waschpuffer (Tris-EDTA-Puffer 1:10) waschen
3. 30 min. mit Primary Antibody (KPNA2 / 1:20) inkubieren
4. 5 min. in Waschpuffer waschen
5. 30 min. mit Antigoat-Antikörper + HRP inkubieren
6. 5 min. in Waschpuffer waschen
7. 10 min. in DAB geben und dann in destilliertem Wasser aufbewahren.

Für die beschriebene Färbung mit dem Antikörper wurde der automatisierte Nexes Immunostainer entsprechend den Instruktionen des Herstellers verwendet.

3.4.4 Hämatoxylin-Färbung der Gewebeschnitte

1. 1 min. Spülen in dest. Wasser
2. 1 min. Färben in Hämatoxylin
3. 15 min. Bläuen in Leitungswasser (warm)
4. Spülen in Leitungswasser (kalt, 2x)
5. Eindeckeln mit Entellan und Deckglas

3.4.5. Auswertung

Normales testikuläres Parenchym wurde als interne Positivkontrolle für KPNA2 gewählt. Für die Negativkontrolle wurde auf den Antikörper verzichtet. Die gefärbten Schnitte wurden von einem erfahrenen Pathologen (Peter J. Wild) ohne Kenntnis der klinischen Daten ausgewertet. Als positive KPNA2-Immunreaktivität wurde eine starke Kernanfärbbarkeit in mindestens 10% der Tumorzellen definiert.

3.5 *Statistische Auswertung der Daten*

Für die statistischen Analysen verwendeten wir SPSS Version 14.0 (SPSS, Chicago, IL). Unterschiede von $p < 0.05$ wurden als statistisch signifikant erachtet. Kontingenztabellenanalysen und 2-seitige Fisher Exakt-Tests wurden zur Untersuchung der Assoziation zwischen klinisch-pathologischen und immunhistochemischen Parametern herangezogen.

EFS- und OS-Kurven, in denen Patientinnen mit und ohne entsprechende Faktoren miteinander verglichen wurden, berechneten wir mittels der Kaplan-Meier-Methode, wobei die Signifikanz durch 2-seitige log rank-Statistiken bewertet wurde. OS und EFS gingen aus der Randomisierung in der WSG-AM-01-Studie hervor. Für die Analyse des EFS dienten die Daten entsprechend den nach Protokoll gelaufenen klinischen Nachuntersuchungen zum jeweiligen Zeitpunkt, für die des OS die letzte tumorfreie klinische Nachuntersuchung bzw. das Todesdatum.

Um die unabhängige prognostische Relevanz der KPNA2-Immunreaktivität zu testen, haben wir ein stufenweises multivariablen Cox-Regressionsmodell benutzt. Das Limit für die Rückwärtseliminierung lag bei $p = 0,01$. Die Proportionalität für alle Variablen wurde mittels log-negativ-log-Überlebens-Verteilungsfunktionen erhoben.

4 Ergebnisse

4.1 Methodische Erfahrungen

Für die Analyse der genetischen Instabilität wurde zunächst aus Normal- und Tumorgewebe jeder Probe genomische DNA mittels Mikrodisektion isoliert und aufgereinigt. Die gewonnene DNA wurde dann mittels PCR amplifiziert, wobei das Ergebnis der Amplifikation mit dem TBP-Primer als Maß für die Qualität der DNA gewählt wurde. Dieser Primer hatte sich in vorangehenden Experimenten als besonders gut amplifizierbar erwiesen. Die PCR-Produkte wurden dann mittels Fragmentanalyse auf Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Allelverluste (LOH) untersucht. Bei dieser Methode wurden fluoreszenzmarkierte Primer eingesetzt, die PCR-Produkte dann elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Laser quantitativ vermessen, so dass man ein probenspezifisches Muster von Allel-Peaks erhielt. Im Folgenden wurden vier weitere ausgewählte Primer amplifiziert. Im Sinne einer Ersparnis an Arbeitszeit und Aufwand wurde primär eine Multiplex-PCR mit den Primern D11S988, D18S51, D1S549 und 21S1436 versucht. Als diese keine befriedigenden Resultate erbrachte und auch eine Primerkombination in Triplex-PCRs fehlschlug, wurden die Primer einzeln amplifiziert. Die Instabilität der amplifizierten Mikrosatelliten war durch die Anwesenheit zusätzlicher Allel-Peaks im Tumorgewebe charakterisiert, deren Länge durch Expansion oder Kontraktion der repetitiven Sequenz verändert war. Ein LOH zeichnete sich durch den im Vergleich relativen Verlust eines Peaks aus, sprich bei einer errechneten Ratio beider Peaks > 2 bzw. $< 0,5$.

Die Amplifizierbarkeit der verschiedenen Marker war abhängig vom Alter der Probe, der Güte der Einbettung sowie der durch die Mikrodisektion gewonnenen Zellzahl. Wichtigster limitierender Faktor bei der Amplifikation war die Anzahl mikrodisezierter Zellen. Zu niedrige Zellzahlen führten zu falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen, v.a. bei der LOH-Analyse. Dietmaier et al. hatten bereits darauf hingewiesen, dass zur verlässlichen MA aus Paraffinmaterial mindestens 30 Zellen notwendig sind [Dietmaier et al., 1999]. Ein Problem, das sich hieraus ergab, stellte die sog. inhomogene präferentielle Amplifikation dar, welche zu LOH-ähnlichen Bandenmustern führt. Die gefundenen genetischen Veränderungen wurden jeweils durch eine zweite PCR mit nachfolgender Fragmentanalyse bestätigt.

4.2 Charakteristik des Patientenkollektivs

Tab 4.1: Klinisch-pathologische Patientendaten und Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen:

Klinisch-pathologische Daten	n (analysierbar)	%
Alter bei Diagnose		
≤ 50 Jahre	123	47,9
> 50 Jahre	113	52,1
Tumorgröße		
< 5 cm	157	67,1
≥ 5 cm	77	32,9
Grad		
G1	15	6,4
G2	127	54,5
G3	91	39,1
Anzahl pos. LK		
<15	108	45,8
≥15	128	54,2
Immunhistochemie		
Östrogenrezeptor (ER)		
negativ	126	55,8
positiv	100	44,2
Progesteronrezeptor (PR)		
negativ	136	61,3
positiv	86	38,7
Her-2/neu		
negativ (0/1)	185	81,1
positiv (2+/FISH+ or 3+)	43	18,9
p53		
negativ (<10%)	159	70,4
positiv (≥10%)	67	29,6
MIB1		
negativ	95	42,0
positiv	131	58,0
EGFR		
negativ (0-2+)	197	85,7
positiv (3+)	33	14,3
KPNA2		
negativ (<10%)	117	61,3
positiv (≥10%)	74	38,7
Molekulare Klassifikation ⁹		
luminal A	61	26,2
luminal B	29	12,4
MMN	65	27,9
Her-2/neu	49	21,0
basal-like	29	12,4

Insgesamt wurde in dieser Arbeit die Tumor-DNA von 236 metastasierten Mammakarzinomen auf genetische Veränderungen hin untersucht. Sämtliche Proben stammten von Probandinnen einer zwischen Juni 1995 bis Juni 2002 durchgeführten, prospektiven Phase III

Studie, in der eine Hochdosis-Chemotherapie (HDCT) mit autologer Blutstammzelltransplantation (ASZT) versus Standard getestet wurde (WSG-AM-01 Studie). Es fand eine randomisierte Verteilung auf die beiden Gruppen statt, wobei 116 Patientinnen auf den HD-Arm und 120 Patientinnen auf den DD (dosisintensiviert)-Arm entfielen. Im Standardarm wurden vier Zyklen E₉₀C₆₀₀ (Epirubicin/Cyclophosphamid), gefolgt von drei Zyklen C₄₀₀M₄₀F₆₀₀ (Cyclophosphamid/Methotrexat/5-Fluorouracil) im 2-wöchigen Abstand verabreicht. Die HDCT bestand aus zwei Zyklen E₉₀C₆₀₀ (Epirubicin/Cyclophosphamid) im 2-wöchigen Abstand, gefolgt von zwei Zyklen E₉₀C₃₀₀₀T₄₀₀ (Epirubicin/Cyclophosphamid/ Thiotepa) im 3-wöchigen Abstand. Die HDCT wurde sowohl im Rahmen einer adjuvanten Chemotherapie bei Patientinnen mit ausgedehnter Lymphknotenmetastasierung (Level III) als auch bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom durchgeführt. Das Patientenkollektiv war durch einen hohen Anteil weit fortgeschrittener metastasierter Mammakarzinome charakterisiert. So lag bei fast einem Drittel (32,9%) der Patientinnen die Größe des Primärtumors bei mindestens 5 cm. 93,6% aller Patientinnen hatten G2- und G3-Tumoren, wobei der Anteil der G3-Tumoren allein bei 39,1% lag. Alle Patientinnen hatten mindestens 10 pos. LK-Metastasen und bei 54,2% waren mindestens 15 LK positiv. 66 Patientinnen (28%) hatten sogenannte dreifach negative Tumoren, d.h. immunhistochemisch negativ für ER, PR und Her-2. Patientinnen mit dreifach negativen Tumoren waren signifikant jünger (Median 45,2 Jahre \pm 9,0 vs. 51,2 \pm 8,1; $p < 0,001$). Die dreifach negativen Tumoren waren weniger differenziert (57% vs. 31%, $p = 0,001$) und wiesen eine EGFR-Überexpression (34% vs. 7%, $p < 0,001$) auf. Darüber hinaus waren Hormonrezeptor-negative Tumoren signifikant mit geringerem Differenzierungsgrad (60% vs. 23,2%, $p = 0,001$) und einer gesteigerten Expression von MIB-1 (67% vs. 52%, $p = 0,028$), Her-2/neu (31% vs. 9,6%; $p < 0,001$), und EGFR (28% vs. 4%, $p < 0,001$) assoziiert. Die mittlere Nachbeobachtungszeit der 236 Patientinnen betrug 48,5 Monate. In beiden Gruppen musste jeweils eine Patientin aus der Wertung genommen werden. In der HD-Gruppe traten 76 gegenüber 59 Ereignissen in der DD-Gruppe auf (Abb. 4.1a). Das mittlere EFS betrug 77,3 Monate in der HD-Gruppe und 73,5 Monate in der DD-Gruppe. Das mittlere OS lag bei 77,9 Monaten in der HD-Gruppe gegenüber 77 Monaten in der DD-Gruppe.

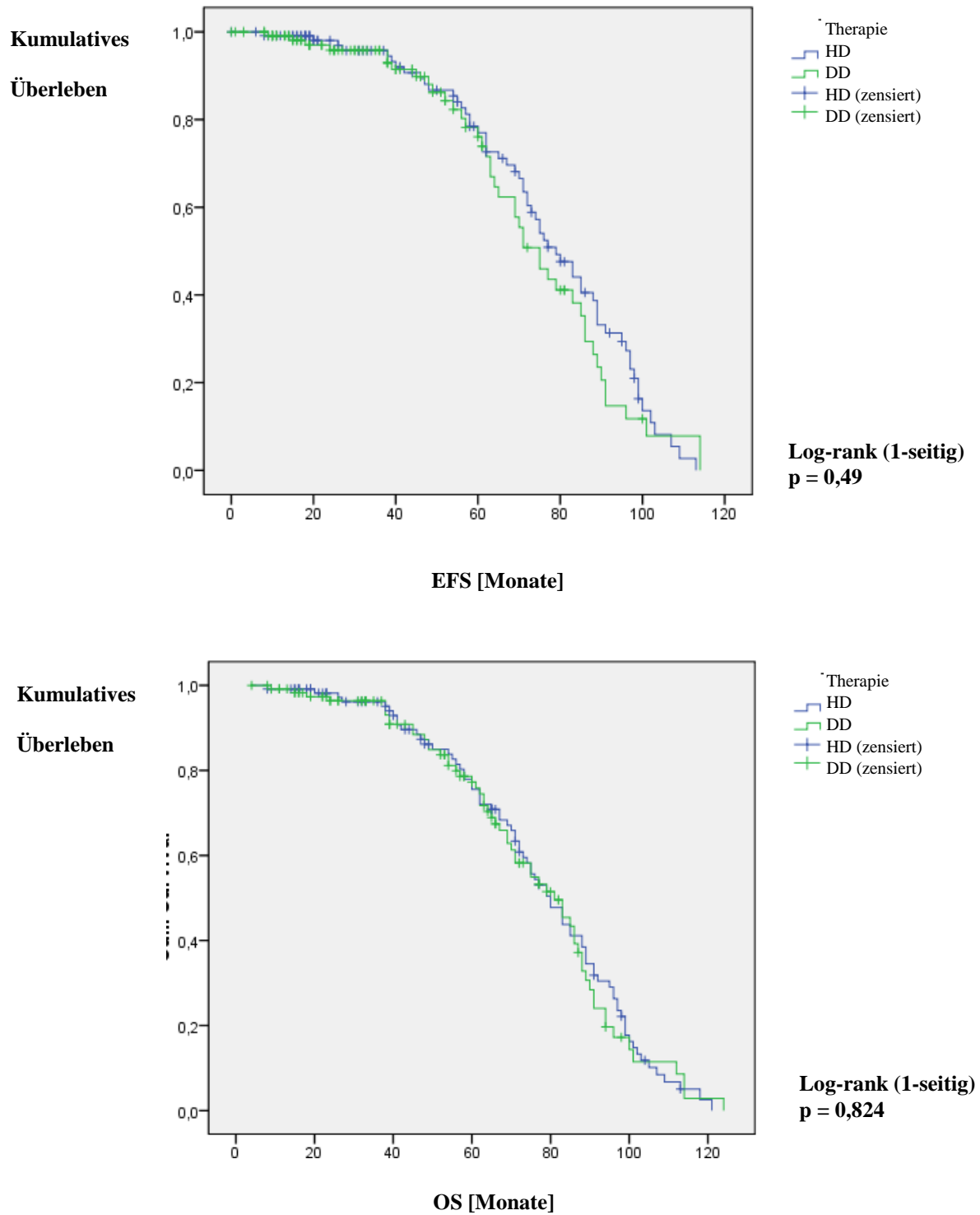


Abb. 4.1 (a und b): (a) Ereignisfreies Überleben (EFS) und (b) Gesamtüberleben (OS) der 236 Patientinnen

Tab. 4.2 a,b: Überlebenszeiten (Monate) mit 95%- Konfidenzintervall getrennt für HDCT und DDCT**a) Ereignisfreies Überleben:** n=234, 132 Zensierungen (56,4%)

	Mittelwert	95%-KI	Median	95%-KI
HDCT (n = 115, 59 Ereignisse)	77,3	[72,1; 82,5]	79	[70,8; 87,2]
DDCT (n = 119, 43 Ereignisse)	73,5	[67,6; 79,5]	75	[66,5; 83,5]

b) Gesamtüberleben: n=234, 135 Zensierungen (42,3%)

	Mittelwert	95%-KI	Median	95%-KI
HDCT (n = 115, 76 Ereignisse)	77,9	[72,9; 83,0]	80	[72,7; 87,3]
DDCT (n = 119, 59 Ereignisse)	77	[71,4; 82,5]	81	[69,8; 93,2]

4.3 Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Chromosomale Instabilität (CIN) beim Mammakarzinom

Bei den 191 ausgewählten Patientinnen stand jeweils ein in Paraffin eingebetteter Gewebekblock mit Tumor- und Normalgewebe zur Verfügung, welche dann jeweils auf MSI, LOH, p53-Mutation und KPNA2-Expression untersucht werden sollten. Für die MA konnten 156 Tumoren verwendet werden. Bezogen auf die Anzahl interpretierbarer Loci in Primärtumoren (n=156) zeigten 11 Loci eine sichere MSI (7,1%) und 32 Loci einen LOH (20,5%). Die Proben mit häufigen chromosomalen Deletionen wurden als Tumoren mit instabilem chromosomalen Genotyp klassifiziert (CIN- positiv)

Tab. 4.3 gibt den LOH- bzw. MSI-Status an den untersuchten Genorten wieder.

Tab. 4.3: Ergebnisse der MSI- bzw. LOH-Analyse bzgl. der untersuchten Primer

	Primer	MSI	LOH	n	NA
Dinukleotide	D11S988	0	0	156	95
	TBP	5	15	156	56
Trinukleotide	D18S51	5	7	156	106
	D1S549	1	10	156	125
	21S1436	0	4	156	95
Tetranukleotide	Summe	11	36	780	477
	%	1,4	4,6		61,2

NA = Daten nicht verfügbar

Für eine große Anzahl von Tumoren war es nicht möglich, ein interpretierbares Ergebnis zu erzielen (61,2%). Ursache dafür war entweder ein Ausbleiben der Amplifikation oder ein nicht auswertbares Bandenmuster. Die gesamte Ausfallrate aller getesteten Loci betrug 61% (477/780). Einzelne Primer zeigten häufiger Ausfallerscheinungen. So war der Primer TBP in

56 von 156 Loci (36%) nicht auswertbar. Bei den anderen 4 Primern ergaben sich die folgenden Ausfallraten: D11S988 (61%), D18S51 (68%), D1S549 (61%) und 21S1436 (80%). Der Erfolg einzelner Primer bei der MSI- Detektion variierte erheblich. Die Ausfallraten waren also in beiden Fällen (MSI und LOH) sehr hoch und die Ergebnisse korrelierten jeweils nur in 18 % der MSI-positiven Tumoren und in etwa 28% der LOH-positiven Tumoren mit den Ergebnissen aus der p53-Analyse. Eine signifikante Aussage konnte in beiden Fällen nicht getroffen werden.

4.4 p53: Immunhistochemie und Sequenzierung

4.4.1 Sequenzierung

Bei der Sequenzierung des p53-Gens (Exon 5-9) wurden sowohl missense-Mutationen – Punktmutationen, die für eine andere Aminosäure kodieren als der Wildtyp – als auch sog. stumme Mutationen entdeckt, deren mutiertes Codon für die gleiche Aminosäure wie die der zugehörigen Wildtyp-Sequenz stand und somit nicht zu funktionell wirksamen Veränderungen führten. Von insgesamt 236 Tumoren konnten wir für 56 eine missense-Mutation nachweisen. Da bei 68 Tumoren keine Auswertung möglich war, ergibt dies 33,3% (56/168). Daneben fanden wir 37 stumme Mutationen. Bei einem Ausfall von 91/236 Proben ergeben sich 25,5% (37/145). Sämtliche Mutationen sollten in einer zweiten Nested-PCR mit nachfolgender Sequenzreaktion verifiziert werden, um Polymerasefehler auszuschließen. Die Validierung der p53-Sequenzierung erwies sich als problematisch, da sich in einigen Fällen die Mutationen nicht bestätigen ließen. Mehrmaliges Wiederholen und zuletzt der Wechsel zu einer spezifischeren Taq-Polymerase konnten die Ausbeute an Mutationen nicht merklich steigern. Letztlich konnte nur in 10,7% (18/168) eine missense-Mutation und in 13,1% (19/145) eine stumme Mutation validiert werden. Der aus Tab. 4.5 zu entnehmende enge Zusammenhang ($p = 0,001$) zwischen der p53-Mutations-Analyse und der Expression in der p53-Immunhistochemie aber lässt auf eine Verwertbarkeit unserer Ergebnisse im ersten Durchgang schließen und die Ausfälle im zweiten Durchgang auf methodische oder materialbedingte Ursachen zurückführen. Der statistische Zusammenhang zwischen der p53-Mutations-Analyse und der Expression in der p53-Immunhistochemie ergibt sich aus der verlängerten Halbwertszeit infolge der Missense-Mutation, so dass diese Tumoren eine Expression des p53-Proteins zeigten, die stummen Mutationen jedoch immunhistochemisch negativ waren [Finlay et al., 1988].

Die p53-Mutationen waren assoziiert mit positivem Her-2/neu-Status ($p < 0,001$) sowie mit erhöhter Proliferation ($p = 0,005$). Außerdem ergab sich eine signifikante Korrelation mit erhöhtem histologischen Grad ($p < 0,001$) und ER- ($p = 0,05$) (Tab. 4.4).

Tab. 4.4: Klinisch-pathologische und immunhistochemische Parameter in Beziehung zu den p53-Mutationen.

		P53 mutiert			
			0	1	p*
		n (analysierbar)	117	74	
Klinisch- pathologische Daten					
Alter bei Erstdiagnose					
	<50 Jahre	75	53	22	0,580
	>50 Jahre	74	56	18	
Tumorgröße					
	< 5 cm	118	85	33	0,652
	> 5 cm	31	24	7	
Grad					
	G1	6	6	0	<0,001
	G2	74	64	10	
	G3	62	38	24	
Immunhistochemie					
ER					
	negativ	77	52	25	0,05
	positiv	64	53	11	
PR					
	negativ	87	62	25	0,322
	positiv	45	44	11	
Her-2/neu					
	negativ (0/1)	81	70	11	<0,001
	positiv (2+/FISH+/3+)	64	38	26	
P53					
	negativ	98	92	6	<0,001
	positiv	45	14	31	
ki-67/MIB1					
	negativ (<10%)	56	49	7	0,005
	positiv (>10%)	86	57	29	
EGFR					
	negativ (0-2)	121	94	27	0,106
	positiv (3+)	22	13	9	

§ 0.06 (1-seitige Test)

*Fisher's Exakt Test, 2-seitig

n (missense mt) = 37

4.4.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Ergebnisse wurden in Kooperation mit Fr. Dr. R. Diallo-Danebrock, Universität Düsseldorf erhoben. Aus Tabelle 4.5 ist ersichtlich, dass die in der

Sequenzierung nachgewiesenen Mutationen signifikant mit der Immunhistochemie für p53 korrelierten ($p < 0,001$).

Tab. 4.5: Kreuztabelle p53-Mutation * Immunhistochemie p53

		Immunhistochemie p53			
		negativ	positiv		
p53-Mutation	negativ	92	14	106	Exakter Test nach Fisher (2-seitig): $p < 0,001$
	positiv	6	31	37	
		98	47	143	

Zwischen Patientinnen mit oder ohne p53-Mutation bestand kein Unterschied für EFS ($p = 0,77$) und OS ($p = 0,49$) (Tab. 4.6).

Tab 4. 6: Ereignisfreies und Gesamtüberleben in Bezug zum p53- Status

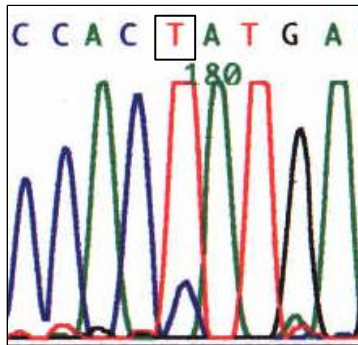
		Ereignisfreies Überleben (EFS)			Gesamtüberleben (OS)	
		Fälle	Ereignisse	p*	Ereignisse	p*
p53- Mutation	1	39	23	0,77	18	0,49
	0	108	60		41	

*log rank

Die Ausfälle in der Auswertung ergaben sich daraus, dass Tumoren, die bei zweimaliger Testung mit dem TBP-Primer, keine auswertbaren Ergebnisse lieferten, nicht sequenziert und somit die entsprechende DNA als nicht verwendbar klassifiziert wurde. Versuche, in diesen Fällen neue DNA durch erneute Mikrodisektion zu erlangen, scheiterten meist an mangelndem Tumormaterial. Schließlich wurden die Mutationen mit Hilfe der „IARC TP53 Mutation Database“ der „International Agency for Research on Cancer“ (<http://www-p53.iarc.fr/Somatic.html>) näher klassifiziert. Abbildung 4.2 stellt exemplarisch drei Sequenzgele mit Punktmutationen dar.

Abb. 4.2: Sequenzgel-Beispiele für Mutationen im p53-Gen

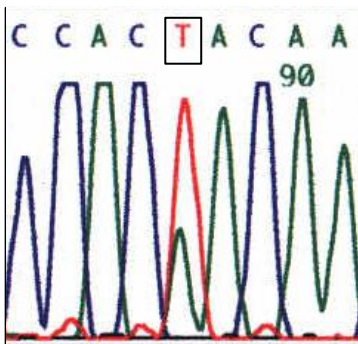
Exon 5: Probe 115



Codon 179: hemizygote Mutation

CAT → TAT
(His) (Tyr)

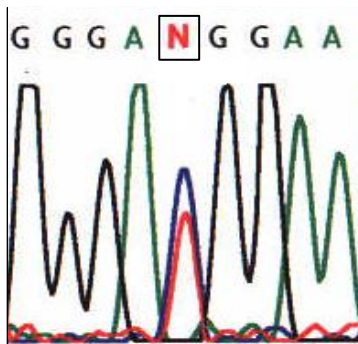
Exon 7: Probe 25



Codon 234: heterozygote Mutation

TAC → AAC
(Tyr) (Asn)

Exon 8: Probe 75



Codon 267: heterozygote Mutation

CGG → TGG
(Arg) (Trp)

4.5 KPNA2-Immunhistochemie

Wir stellten in 73 (39,3%) von 191 Fällen eine nukleäre immunhistochemische Anfärbbarkeit für KPNA2 von mindestens 10% fest. Dabei zeigten sich durchschnittlich 15% der Zellkerne und in einem Fall sogar 70% positiv. Nachfolgend wurde die KPNA2-Immunhistochemie mit klinisch-pathologischen und immunhistochemischen Daten in Beziehung gesetzt (Tab. 4.7).

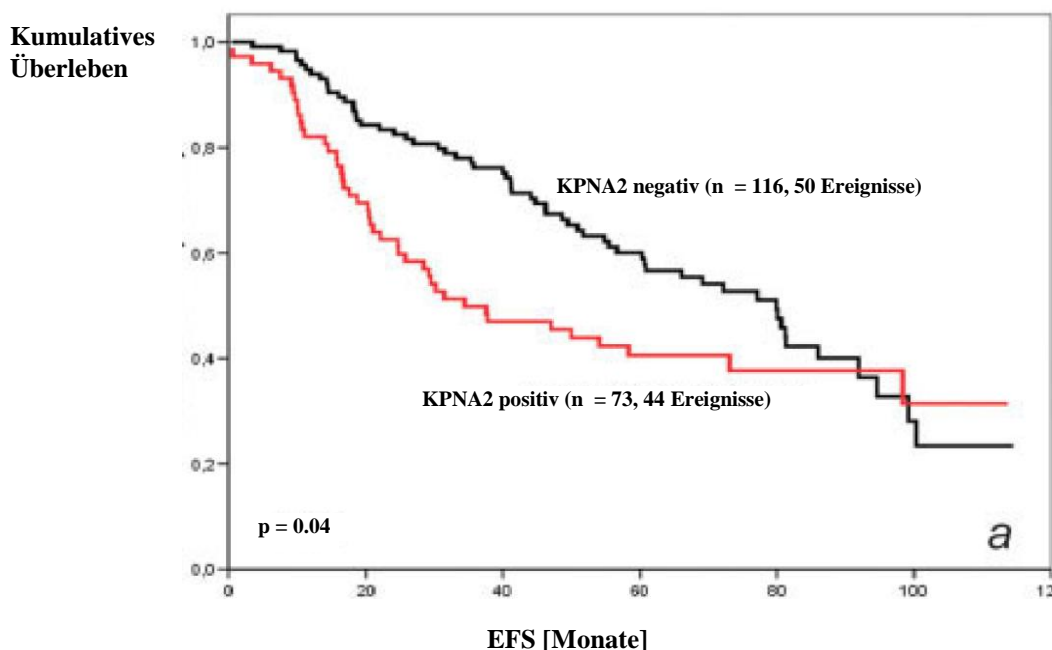
Tab.4.7: Klinisch-pathologische und immunhistochemische Parameter in Beziehung zur KPNA2-Immunreaktivität im Zellkern.

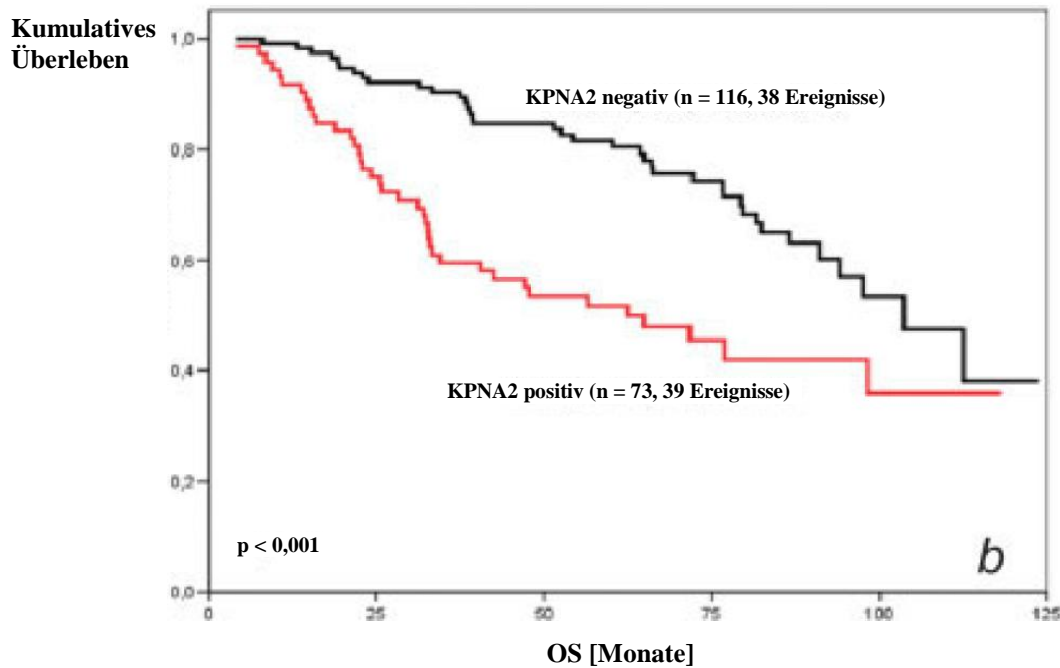
		KPNA2 Immunreaktivität < 10% ≥ 10%		p
	n (analysier- bar)	117	74	
Klinisch-pathologische Daten				
Alter bei Diagnose				
< 50 Jahre	99	59	40	0,659
50 Jahre	92	58	34	
Tumorgroße				
< 3 cm	86	49	37	0,31
≥ 3 cm	104	67	37	
Grad				
G1	10	10	0	< 0,001
G2	100	79	21	
G3	79	27	52	
Immunhistochemie				
ER				
negativ	109	56	53	0,001
positiv	76	57	19	
PR				
negativ	111	54	57	0,004
positiv	75	60	15	
Her-2/neu				
negativ (0/1)	154	103	51	< 0,001
positiv (2+/FISH+ or 3+)	34	11	23	
p53				
negativ (< 10%)	132	91	41	0,004
positiv (≥ 10%)	55	24	31	
Ki-67				
negativ (< 10%)	75	69	6	< 0,001
positiv (≥ 10%)	112	47	65	
EGFR				
negativ (0-2+)	157	104	53	0,004
positiv (3+)	30	11	19	
Molekulare Klassifikation ⁹				
luminal A	49	38	11	< 0,001
luminal B	21	13	8	
MMN	53	46	7	
Her-2/neu	42	15	27	
basal-like	26	5	21	

*Fisher's Exakt-Test (2-seitig)

Eine positive Kernanfärbbarkeit für KPNA2 in mindestens 10% der Tumorzellkerne war signifikant assoziiert mit höherem Tumorgrad ($p < 0,001$), ER-Negativität ($p = 0,001$), PR-Negativität ($p = 0,004$), p53-Expression in $\geq 10\%$ der Zellen ($p = 0,002$), Her-2/neu-Positivität ($p < 0,001$), erhöhtem Proliferationsindex (MIB-1/ki-67, $p < 0,001$) und EGFR-Expression ($p = 0,004$). Eine Assoziation der KPNA2-Expression mit dem Alter bei Erstdiagnose oder der Tumorgroße konnte nicht gefunden werden. Die Immunhistochemie war zudem signifikant ($p < 0,001$) assoziiert mit sogenannten basal-like (81%) und Her-2/neu Subtypen (64%) (entsprechend der Tumoreinteilung mittels k-clustering, Einzelheiten siehe Diallo-Danebrock et al., 2007). Zudem konnte für die KPNA2-Expression ein signifikant kürzeres EFS mit einem geschätzten mittleren EFS von 34,4 Monaten (95% KI: 13,7-55,1 Monate) verglichen mit 79,9 Monaten (95% KI: 66,1-93,7 Monaten) bei Tumoren mit negativer KPNA2-Anfärbbarkeit nachgewiesen werden ($p = 0,04$; Abb. 3a). Patientinnen mit KPNA2-positiven Tumoren ($\geq 10\%$) hatten ein geschätztes durchschnittliches OS von 62,5 Monaten (95% KI: 32,3-89,7 Monaten) im Vergleich zu 103,6 Monaten (95% KI: 87,7-119,4 Monaten) bei KPNA2-Negativität ($p < 0,001$ Abb. 3b).

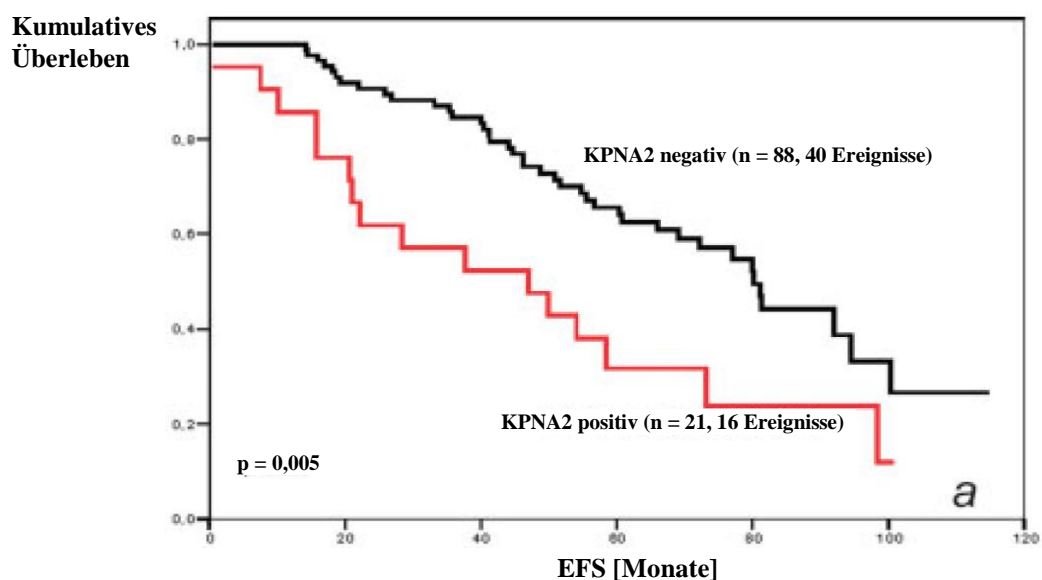
Abb. 4.3 (a und b): Kaplan-Meier-Überlebenskurven für EFS (a) und OS (b) der 191 HRBC-Patientinnen mit negativer ($<10\%$) und positiver ($\geq 10\%$) Immunreaktivität für KPNA2.

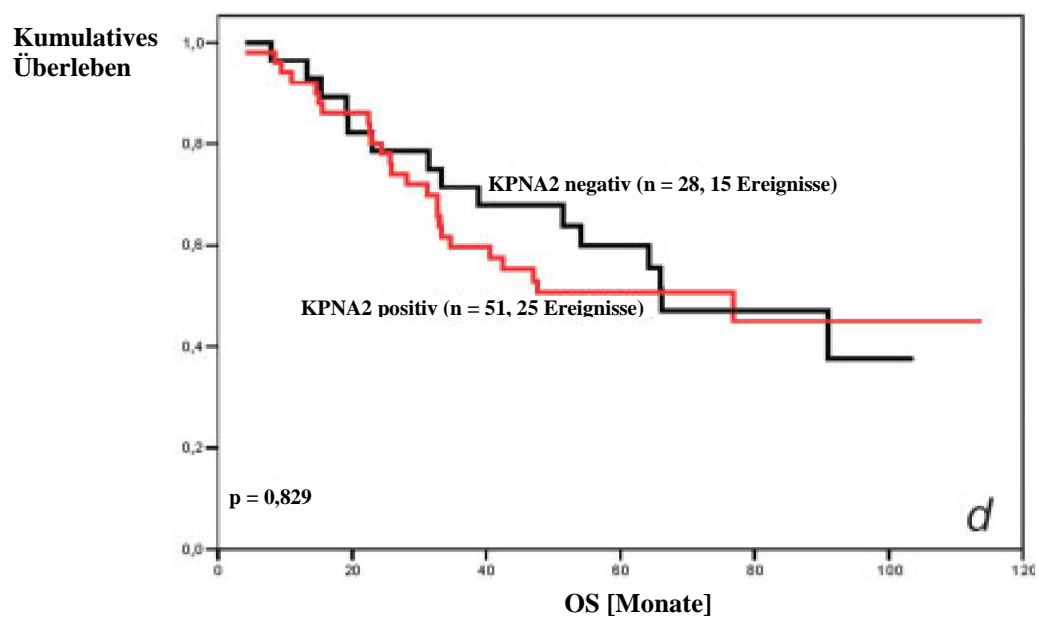
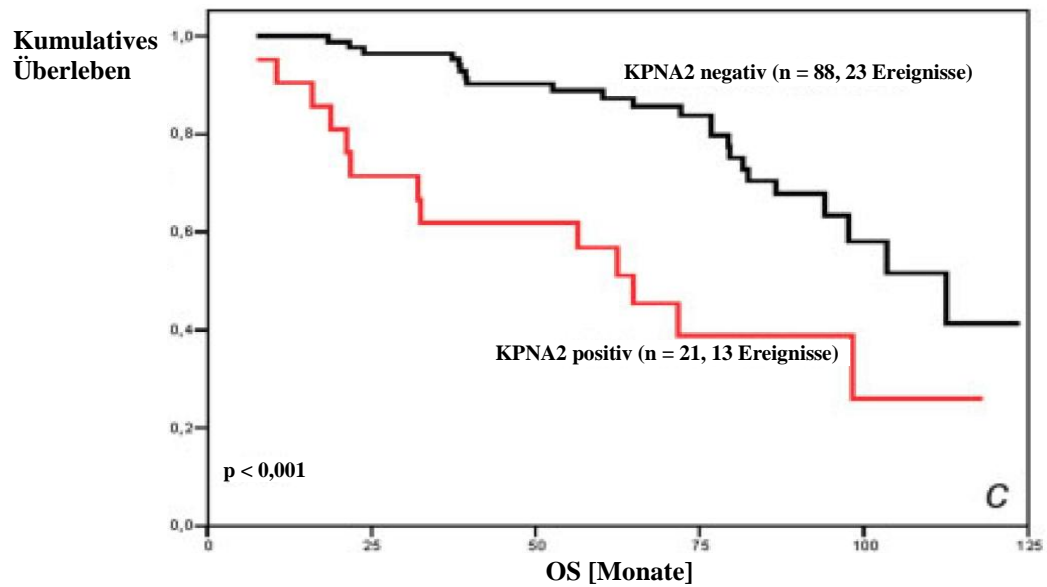
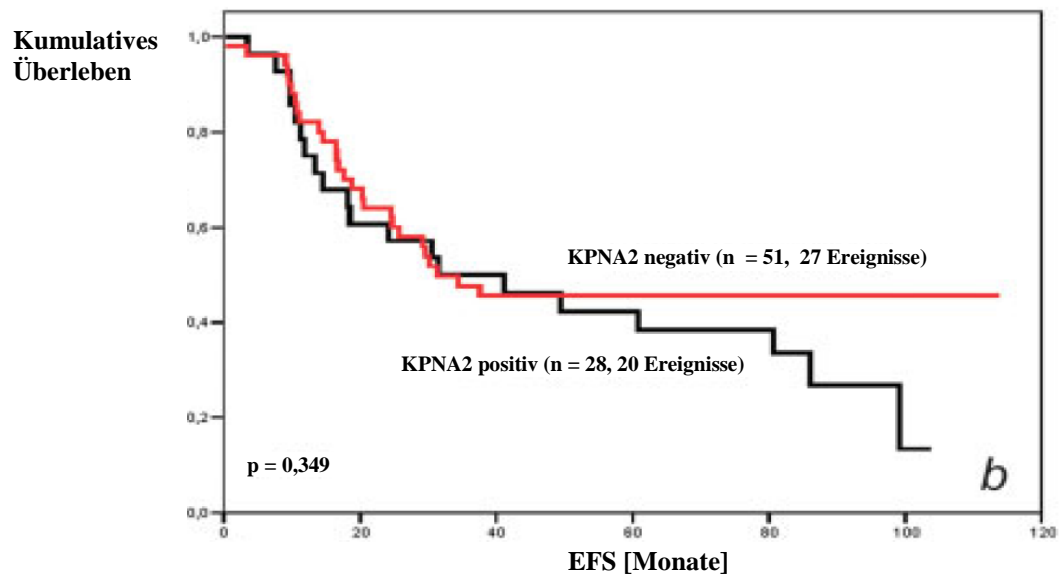




In einer explorativen Subgruppenanalyse (G1 – G3) wurde eine signifikante Assoziation der KPNA2-Expression mit dem EFS und dem OS nur bei histologisch mäßig differenzierten Tumoren (G2) gefunden. Bei den G2-Tumoren ergab sich ein mittleres EFS von 80 Monaten (95% KI: 71-89 Monate) bei Patienten mit KPNA2-negativen Tumoren verglichen mit 47 Monaten (95% KI: 15-79 Monaten) bei KPNA2-positiven Patientinnen ($p = 0,0048$; Abb. 4a,c). Weiterhin lag das geschätzte mittlere OS bei den Hochrisiko-Brustkrebs-Patientinnen mit G2-Tumoren und geringer KPNA2-Immunreaktivität bei 113 Monaten (95% KI: 91-134 Monate) gegenüber 65 Monaten (95% KI: 46-84 Monate) bei KPNA2-positiven Patientinnen ($p = 0,0003$; Abb. 4b/d). Für G3- Tumore ergab die KPNA2-Expression keinen signifikanten Unterschied im EFS oder OS. Bei den G1-Tumoren lag die nukleäre KPNA2-Immunreaktivität konstant unter 10%.

Abb. 4.4 (a,b und c,d): Prognostischer Effekt der KPNA2-Expression in den Untergruppen der HRBC mit G2- (a,b) und G3-Tumoren (c,d).





Eine multivariate Cox-Regressionsanalyse wurde verwendet um den prognostischen Einfluss der KPNA2-Expression auf EFS und OS in Bezug auf andere klinisch-pathologische und tumor-biologische Faktoren darzustellen. Als Variablen wurden Behandlungsschema, nukleäre KPNA2-IHC, Alter bei Erstdiagnose, Tumorgröße, histologischer Grad, ER- und PR-Status, p53-IHC, Ki-67-IHC, EGFR-IHC, HER-2/neu-Status und die molekulare Klassifikation, definiert nach Diallo et al., 2007, herangezogen (Tab. 4.4).

Tab. 4.8: Multivariate Cox-Regressionsanalyse der Faktoren mit möglichem Einfluss auf EFS (a) und OS (b): Therapie, Alter, Tumorgröße, ER, PR, histologischer Grad, Her-2/neu IHC, Ki-67 IHC, p53 IHC, KPNA2 IHC, und molekulare Klassifikation definiert nach Diallo et al.

a (EFS):

	Vergleich	p	Hazard ratio [95% KI]
Therapie	HD vs. DD	< 0,001	0,44 [0,26 – 0,62]
Tumorgröße (cm)	≥ 5 vs. ≥ 2-5 vs. < 2	0,04	1,70 [1,18 – 2,45]
Molekulare Klassifikation	kontinuierlich	< 0,001	2,63 [1,72-4,02]

* Luminal A vs. luminal B vs. MMN vs. Her-2/neu vs. basal-like.

b (OS):

	Vergleich	p	Hazard ratio [95% KI]
Therapie	HD vs. DD	< 0,001	0,37 [0,22 – 0,61]
Tumorgröße (cm)	≥ 5 vs. ≥ 2-5 vs. < 2	0,047	1,52 [1,00 – 2,32]
Molekulare Klassifikation	kontinuierlich*	< 0,001	2,52 [1,44-4,43]
KPNA2	pos. vs. neg.	0,03	1,86 [1,07-3,23]

* Luminal A vs. luminal B vs. MMN vs. Her-2/neu vs. basal-like.

Die HDCT war unabhängig mit einem längeren EFS (HR = 0,44; 95% KI: 0,26-0,62; $p < 0,001$) assoziiert. Die Faktoren Tumorgröße ≥ 5 cm vs. $\geq 2-5$ cm vs. < 2 cm (HR = 1,7; 95% KI: 1,18-2,45; $p = 0,004$) und IHC-basierte molekulare Klassifikation (nach Diallo et al. basal-like oder Her-2/neu vs. MMN/luminal A /B) (HR = 2,63; 95% KI: 1,72-4,02; $p < 0,001$) waren signifikant mit einem kürzerem EFS korreliert [Diallo et al., 2007]. Außerdem stellte sich die HDCT (HR = 0,37; 95% KI: 0,22-0,61; $p < 0,001$) als unabhängiger prognostischer Faktor für ein längeres OS heraus. Im Gegensatz dazu zeigten sich die Tumorgröße ≥ 5 cm vs. $\geq 2-5$ cm vs. < 2 cm (HR = 1,52; 95% KI: 1,00-2,32; $p = 0,047$), basal-like oder Her-2/neu vs. MMN/luminal A /B (HR = 2,52; 95% KI: 1,44-4,43; $p < 0,001$) und die positive KPNA2-

Anfärbbarkeit (HR = 1,86; 95% KI: 1,07-3,23; p = 0,03) als unabhängig negative Risikofaktoren für das OS.

In einer Subgruppen-Analyse wiesen die Patientinnen in der HD-Gruppe ein längeres EFS im Vergleich zu den Patientinnen in der DD-Gruppe auf, sowohl in den KPNA2-negativen (HR = 0,476; 95% KI: 0,276-0,823; p = 0,008) als auch in den KPNA2-positiven Fällen (HR = 0,524; 95% KI 0,288-0,952 ; p = 0,034). Für das OS war die HDCT nur bei Patientinnen mit einer KPNA2-Expression von < 10% (HR = 0,322; 95% KI: 0,151-0,686; p = 0,003) überlegen. Bei den KPNA2-positiven Fällen zeigte sich nur der Trend einer besseren Wirksamkeit (p = 0,06) (HR = 0,541; 95% KI: 0,287-1,023).

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es die DNA von 191 Mammakarzinomen mit ≥ 10 pos. Lymphknoten zu isolieren und so einer genetischen Analyse zugänglich zu machen. Die Proben stammen von Patientinnen aus einer zwischen Juni 1995 und Juni 2002 durchgeführten prospektiven Phase-III-Studie, in der eine Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Blutstammzelltransplantation versus dosisintensiviertem Standard getestet wurde (WSG-AM-01-Studie). Die Patientinnen mit Mammakarzinomen mit ≥ 10 pos. Lymphknoten werden als sog. Hochrisiko-Brustkrebs-Patientinnen bezeichnet. Untersucht wurden alle Proben auf Mikrosatelliteninstabilität, Allelverluste, p53 sowie Karyopherin α_2 -Expression bei vorliegenden Ergebnissen zur Immunhistochemie der Universität Düsseldorf. Wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist, dass eine positive KPNA2-Kernanfärbbarkeit in mehr als 10% der Tumorzellkerne als unabhängiger negativ prädiktiver Prognosefaktor für das Überleben beim Mammakarzinom anzusehen ist. Wir konnten die Überexpression von KPNA2 ($n = 74$, 39%) in einer univariaten Analyse signifikant mit kürzerem EFS und OS in beiden Therapiegruppen korrelieren. Die multivariate Analyse ergab, dass die KPNA2-Überexpression ein unabhängiger Prognosefaktor für ein vermindertes OS darstellte (HR = 1,86 95% KI: 1,07-3,23) ($p = 0,03$). Die nukleäre KPNA2-Expression ist ein möglicher neuer Prognosefaktor bei nodal-positiven Patienten und könnte ferner auch als Marker für Chemotherapieresistenz dienen für Patientinnen, bei denen die konventionelle Dosismodifikation einer Chemotherapie auf das Mammakarzinom im fortgeschrittenen Stadium wirkungslos bleibt. Im Folgenden sollen die verschiedenen Punkte dieser Arbeit im Einzelnen diskutiert werden.

5.1 Spezifische genetische Analyse durch Mikrodissektion

Für unsere Studie untersuchten wir 191 Mammakarzinome auf verschiedene genetische Veränderungen. Die Methoden zur Probenaufarbeitung, DNA-Isolierung und die anschließende molekulargenetische Untersuchung der Tumoren wurden schon in der Arbeit von Wild et al. etabliert. Besonderen Stellenwert hat hier die Mikrodissektionstechnik, die es ermöglichte, den histologischen Phänotyp mit dem Genotypen in direkte Beziehung zu stellen, indem für eine exakte genetische Analyse nur die relevanten Zellverbände unter mikroskopischer Kontrolle isoliert und bildlich dokumentiert wurden. Dieses Verfahren hat es ermöglicht, PCR-Artefakte infolge Kontamination mit Normalgewebe weitgehend zu eliminieren. Die mittels Mikrodissektion gewonnene DNA aus Tumor- und Normalgewebe wurde dann für die MA zum Nachweis von MSI und LOH, zur Sequenzierung des p53-Gens und für die KPNA2-IHC

verwendet und somit einer genetischen Analyse zugänglich gemacht. Um falsch-positive Ergebnisse durch PCR-Artefakte [Diaz-Cano, 2001] oder Kontamination zu vermeiden, wurden die entdeckten Veränderung jeweils in einer zweiten Untersuchung ausgehend vom Primärtumor verifiziert.

Für die MA ist es wichtig, eine Mindestzahl an Tumorzellen zu gewinnen. Bei der LOH-Analyse können zu niedrige Zellzahlen zu falsch-positiven, sowie zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Entsprechend Dietmaier et al. sollten zur Vermeidung einer inhomogenen biallelischen Amplifikation mindestens 200 Zellen mikrodiseziert werden [Dietmaier et al., 1999]. Dennoch war der Amplifikationserfolg verschiedener Tumoren sehr unterschiedlich. Die hohen Ausfallraten unserer Studie von durchschnittlich 60% in der MA, sowie die Schwierigkeiten bei der Verifizierung der p53-Mutationen erklären sich am ehesten durch die Art des verwendeten Materials. Qualität und Menge der extrahierten DNA von alten Paraffinblöcken war selbst nach Aufreinigung und Präamplifizierung [Dietmaier et al., 1999] nicht mit der DNA-Gewinnung aus Frischmaterial vergleichbar [Greer et al., 1991]. Die Mindestzellzahl zur MA sowie die erforderliche Menge an Gewebe für die IHC und die Sequenzierung konnten nicht in allen Fällen erzielt werden (nach Wild et al. mindestens 80% [Wild et al., 2005]). Wichtig war es auch, die optimal einzusetzende DNA-Menge herauszufinden, um PCR-Artefakte zu verhindern. Dies war mitunter schwierig, da die isolierte DNA-Menge natürlich entsprechend des in der Mikrodisektion gewonnenen Materials je nach Probe variierte. Die erschwerte Verifizierung unserer Ergebnisse deutet auf eine zunehmende Degradierung gewonnener DNA über die Zeit hin. Hierbei ist anzumerken, dass es bei Paraffinblöcken von zahlreichen Einbettungen unterschiedlicher Fixierung bei der Isolierung eventuell zu einer ungenügenden Pufferung des Formalins kommt, was eine Schädigung der DNA nach sich zieht. Probleme bei der KPNA2-IHC waren unzureichendes Tumormaterial, Nekrosen im Zellverband und Artefakte durch die Aufbereitung. Diese traten aber nur in limitiertem Ausmaß auf.

5.2 Prognosefaktoren beim Mammakarzinom

Die in der Onkologie mitunter wichtigste klinische Fragestellung beschäftigt sich mit der posttherapeutischen Überlebenszeit krebskranker Patienten. Beim metastasierten Mammakarzinom findet man hier eine sehr große Variabilität. Die Behandlung bestimmter Patientensubgruppen kann unter ähnlichen Behandlungsschemata zu einem recht unterschiedlichen Therapieansprechen führen.

Ein besonders kontrovers diskutierter Gesichtspunkt ist die Anwendung einer Hochdosis-Chemotherapie mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation (HDCT/ASZT). Es gibt derzeit etwa 10 verschiedene in Studien angewendete HDCT, was deren Vergleichbarkeit erschwert. Mehrere aktuelle Arbeiten sehen keinen Vorteil in der Anwendung beim Brustkrebs [Tokuda et al., 2008; Coombes et al., 2005; Schmid et al., 2005], andere können einen gewissen Benefit für spezifische Patientenkollektive verzeichnen [Zander et al., 2008; Rodenhuis et al., 2006]. Eine Übersicht über verschiedene Studien liefern Hanrahan et al. [Hanrahan et al., 2006]. In einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 12 Jahren konnte für die HDCT/ASZT nach bereits erfolgter Chemotherapie im Vergleich zur alleinigen Standard-Dosis-CT kein Vorteil im EFS oder OS gezeigt werden. Die Patientinnen hatten jeweils ein Mammakarzinom Stadium II mit ≥ 10 pos. LK bzw. Stad. III mit ≥ 4 pos. LK. Das Chemotherapie-Schema war von dem unserer Probanden verschieden, da hier alle zunächst eine SDCT (Fluorouracil, Doxorubicin, Cyclophosphamid) erhielten, und die Weiterbehandlung dann in der einen Gruppe in einer zusätzlichen HDCT/ASZT (Cyclophosphamid, Etoposid, Cisplatin) bestand. Diese Zusammenfassung soll daher nicht als Vergleich zu unserer Studie gelten, sondern den derzeitigen Stand der Forschung aufzeigen. Von insgesamt 13 Studien, die im Zeitraum zwischen 1998 und 2005 veröffentlicht wurden, konnte lediglich in der WSG-AM 01-Studie, aus der unsere Patientinnen stammen, und in der Studie von Roche et al. ein Vorteil einer HDCT im EFS gezeigt werden. Signifikante Unterschiede im OS konnte keine der Studien verzeichnen [Tabelle 5: Hanrahan et al., 2006]. Es zeigt sich also, dass die HDCT bisher noch zu keinem signifikanten Überlebensvorteil beim Brustkrebs geführt hat.

Derzeitiges Bestreben der Forschung ist es daher, prädiktive und prognostische Marker zu entwickeln, die Subgruppen beim Mammakarzinom identifizieren, die durch eine HDCT/ASZT einen Vorteil erlangen. Um diese Subgruppen zu finden, müssen etablierte und neuere Prognosparameter zu diesem Thema diskutiert und deren Stellenwert erörtert werden. Mit diesem Problem beschäftigen sich verschiedene Forschungsgruppen in den letzten Jahren. Wild et al. untersuchte die MSI-high als einen negativen unabhängigen Identifikationsmarker einer schlechten Prognose bei Patientinnen nach HDCT. Großes Interesse findet das TSG p53. Hensel et al. bezeichneten p53 als stärksten prädiktiven Faktor im Überleben nach HDCT mit ASZT beim metastasierten Mammakarzinom [Hensel et al., 2002]. Kröger et al. erweiterten die Aussagekraft von p53 um die Prognostizität [Kröger et al., 2006 Jan]. Das seit kurzem beim Mammakarzinom diskutierte Importprotein KPNA2 könnte diesbezüglich ebenso einen prognostischen Stellenwert besitzen. Dahl et al. haben eine nukleäre KPNA2-Überexpression in den Tumorzellen verglichen mit schwacher oder fehlender Expression in normalen Zellen

beim Mammakarzinom gefunden. KPNA2 ($\geq 10\%$) war zudem mit einem kürzeren EFS assoziiert ($p = 0,0013$) und eine unabhängige negative Korrelation mit dem OS der nodal-positiven Patientinnen konnte dargestellt werden. Dahl folgerte daraus, dass KPNA2 ein potentieller diagnostischer Faktor sein könnte, das Therapieansprechen sowie den Krankheitsverlauf vorhersagen zu können [Dahl et al., 2006].

Zur Anerkennung als neuer Prognosefaktor muss die Relevanz des Markers statistisch in unabhängigen Studien reproduzierbar und einwandfrei belegbar sein. Somit muss die Relevanz des entsprechenden Prognosefaktors in einer multivarianten Analyse dargestellt werden. Er muss also eine höhere prognostische Aussagekraft besitzen als die bisher verwendeten Faktoren. McGuire hat die Kriterien zur Evaluierung prognostischer Faktoren systematisch erörtert [McGuire, 1991].

5.2.1 Etablierte Prognosefaktoren

Beim Mammakarzinom liefert die histopathologische Probenaufarbeitung bis heute die wichtigsten prognostisch relevanten Informationen zur Therapiestratifizierung [Galea et al., 1992]. Vor allem das lokale Ausmaß der Tumorausbreitung (T), der histologische Typ, das histologische Grading (G), die Gefäßinvasion sowie der Lymphknotenbefall (N) sind als signifikante Prognosefaktoren anerkannt. Für die basal-like und die BRCA1-assoziierten Tumoren scheint die Tumorgroße allerdings nicht als Prognosefaktor zu gelten [Foulkes et al., 2008]. Besonders der histologische Differenzierungsgrad ist ein wesentlicher Prognosefaktor [Pereira et al., 1995]. Diese starke Korrelation zwischen dem G-Stadium und dem Langzeitüberleben wurde mehrmals bestätigt [Übersicht in Siah et al., 1999]. Die semiquantitativ beurteilten histo- und zytologischen Merkmale sind dabei Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate [Elston und Ellis, 1991]. Die Merkmale werden mit Kriterien versehen, denen ein bestimmter Punktwert zugeordnet ist. Die Summe der Punktwerte ergibt die Zuordnung zu einem 3-stufigen Grading, welches die Malignitätsrate widerspiegelt. Somit ist die Tumorausprägung aufgrund der histo- und zytologischen Merkmale genau definiert und folglich standardisiert miteinander vergleichbar. Der Lymphknoten-Status ist der wichtigste Faktor in der Voraussage des Überlebens beim Brustkrebs. Patientinnen mit ≥ 10 pos. LK haben erwiesenermaßen eine schlechte Prognose [Hoehne et al., 2008]. Es handelt sich hier um eine durchschnittliche Reduktion der 10-Jahres-Überlebensrate von 75% ohne auf 25-30% mit Lymphknotenbefall. Es wurde eine proportionale Verschlechterung der Prognose zur Anzahl der betroffenen Lymphknoten beobachtet [Fisher 1984; Veronesi et al, 1993].

Große Bedeutung beim Mammakarzinom besitzt der Hormonrezeptor-Status. Neuere Medikamente beeinflussen den Hormonspiegel und inhibieren so den hormonellen Effekt auf den Tumor. Beispiele hierfür sind Tamoxifen[®], ein Östrogen-Antagonist, und Goserelin (Zoladex[®]), ein potenter Gonadotropin-Releasing-Antagonist.

Auch der prognostische Wert des Hormonrezeptor-Status (Östrogen, Progesteron) konnte mehrfach bewiesen werden, was schließlich dazu führte, dass ER-/PR-positive Tumoren mit einem niedrigen und ER-/PR-Rezeptor negative Tumoren mit einem hohen Risiko assoziiert wurden [Konsensuskonferenz St. Gallen, 2005].

Zusammenfassend gelten als anerkannte Prognosefaktoren beim metastasierten Mammakarzinom Hormonrezeptorstatus (ER, PR), Alter bzw. Menopausenstatus, Metastasenlokalisation bzw. Befallsmuster, Zeitintervall zwischen Primärdiagnose und Metastasierung, sowie Ansprechen auf Chemotherapie [Allgäuer et al., 2001]. Neu hinzugekommen ist der Her-2-Status. Das National Cancer Institute [Clark GM, 2001] und die St. Galler Konsensuskonferenz [Thurlimann et al., 2004] liefern adjuvante Therapie-Guidelines auf der Basis der anerkannten prognostischen Faktoren zur Verfügung. Aktuell bieten die TNM-Klassifizierung [Sobin LH, 2003], der Nottingham Prognoseindex [Galea et al., 1992] und Adjuvant Online [<https://www.adjuvantonline.com/>] die meist verwendeten integrierten Prognosemodelle dar.

Die molekularen Prognosefaktoren gewinnen ständig mehr an Bedeutung. Weltweit beschäftigen sich verschiedene Forschungsgruppen damit, prognostische und prädiktive Faktoren für das Mammakarzinom auf molekularer Ebene zu entwickeln.

5.2.2 Molekulare Prognosefaktoren

5.2.2.1 Her-2/neu

Der Anteil der Her-2/neu-positiven Tumore aller Mammakarzinome liegt bei etwa 20%. Diese sind mit einer schlechten Prognose, v.a. bei nodal-positiven Patientinnen, assoziiert [Azim et al., 2008]. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Überexpression des HER-2/neu-Onkoproteins mit kürzerem EFS und OS, sowie mit Resistenz gegenüber einer Hormontherapie und höherer Rezidivrate nach Chemotherapie in Standarddosierung korreliert ist [Kim et al., 2001]. Vor diesem Hintergrund untersuchten verschiedene Studien den Effekt einer HDCT bei Her-2/neu-positiven Patientinnen. Guarneri et al. zogen aus ihrer sowie aus vorangegangenen Studien die Schlussfolgerung gezogen, dass Her-2/neu-positive Patientinnen nicht von einer HDCT profitieren; im Gegensatz zu Her-2/neu-negativen Patientinnen konnte hier kein Vorteil gegenüber konventionellen Chemotherapien demonstriert werden [Guarneri

et al., 2004; Rodenhuis et al., 2006]. Die mittlerweile etablierte klinisch-therapeutische Anwendung von Trastuzumab (Herceptin®), einem monoklonalen HER-2/*neu* Rezeptor-Antikörper, gilt als Meilenstein in der Verwendung molekularer Veränderungen als Target für neue Therapien [Pegram et al., 1998; ebd. et al., 1999]. Die Monotherapie mit Trastuzumab weist eine Ansprechrate von 30% auf, die sich durch Kombination mit einer Chemotherapie verdoppeln lässt [Baumann et al., 2007]. HER-2/*neu* ist nach dem Östrogenrezeptor aktuell als spezifischer Faktor anerkannt, das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie voraussagen. Mit der Einführung von Trastuzumab hat sich der Stellenwert der Her-2/*neu*- Expression gesteigert. Metastasierte Mammakarzinome mit Her-2/*neu*- Überexpression profitieren klinisch von einer Chemotherapie plus Trastuzumab. Somit wird aus dem negativen Prognosefaktor ein zusätzlicher prädiktiver Faktor in Hinsicht auf die antineoplastische Therapie bei Brustkrebs [Ferretti et al., 2007].

5.2.2.2 Mikrosatelliteninstabilitäten

Mikrosatelliten sind kurze repetitive Nukleotidsequenzen im menschlichen Genom [Aaltonen et al., 1993]. In repetitiven Sequenzen neigt die DNA-Synthese zu Fehlern [Liu et al., 1995]. Ein Versagen von sog. DNA-Mismatch-Repair-Genen (MMR) führt zu Veränderungen, die wir als Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI) bezeichnen. In Genen der Wachstumsregulation trägt die daraus folgende Akkumulation an DNA-Defekten infolge inadäquater Reparaturmechanismen zur Tumorentwicklung und Progression bei [Rhyu, 1996; Parsons et al., 1995]. Schon 1993 demonstrierten Ionov et al. die genetische Instabilität in Form von Längenpolymorphismen der Mikrosatelliten bei kolorektalen Karzinomen als neuen Mechanismus der Entstehung maligner Tumoren.

Für die Mikrosatellitenanalyse (MA) stehen hauptsächlich zwei Methoden zur Verfügung: zum einen gibt es den direkten Nachweis der Mutationen in den kurzen Oligonukleotid-Repeats. Mittels spezieller PCR werden die zu untersuchenden Areale vervielfältigt, in einer anschließenden Elektrophorese wird dann die durch Insertion oder Deletion veränderte MS-Länge sichtbar gemacht. In der zweiten Methode wird die Expression von Produkten der MMR-Gene (v.a. hMLH1 und hMSH2) mittels IHC dargestellt, wobei verminderte oder fehlende Kernanfärbbarkeit in den Tumorzellen auf eine MSI hinweisen. Die Ergebnisse des Verfahrens, das sich ebenfalls der PCR bedient, hängen hauptsächlich von der Art des Primers (Mono-, Di-, Tri-, Tetranukleotid-), der Lokalisation (in kodierenden oder nicht-kodierenden Regionen), der Anzahl der verwendeten Primer und natürlich von den Kriterien für positive MSI ab. Diese Kriterien variieren z. T. erheblich und beinhalten die Anzahl der verwendeten Primer, sowie die geforderte Anzahl der Primer, deren Positivität eine MSI bestätigen. Emp-

fehlungen für die Kriterien, wie sie es beim HNPCC gibt, existieren für das Mammakarzinom nicht. Die immunhistochemische Analyse der MMR-Genexpression hat sich mehrfach als ein sehr spezifisches und sensitives Verfahren für die MSI herausgestellt und korreliert gut mit dem PCR-basierten Verfahren [Hatch et al., 2005; Lindor et al., 2002; Chaves et al., 2000]

Eine Reihe weiterer Tumoren anderer Herkunft ist auf MSI untersucht worden. Dabei fanden sich für einige sporadische Karzinome, wie z. B. in Magen, Endometrium oder Ovar, MSI-Raten von bis zu 15% [Hamelin et al., 2008; Woerner et al., 2006]. Die Angaben zur Prävalenz der genetischen Instabilität repetitiver DNA-Sequenzen variieren für einige Tumorentitäten mitunter erheblich. Beim Mammakarzinom liegen diese zwischen 0% und 100%.

Die Meinungen über die Rolle der MSI in der Karzinogenese beim Mammakarzinom gehen weit auseinander. Studien, welche die These der MSI als Zeichen genetischer Instabilität beim Mammakarzinom unterstützen [Wild et al., 2004; Murata et al., 2003; Méndez et al., 2001; Richard et al., 2000; Shen et al., 2000; Zekri et al., 1999], stehen anderen gegenüber, welche die MSI beim Brustkrebs als selten bzw. nicht existent erachten [Kim et al., 2007; Khilko et al., 2007; Adem et al., 2003; Lee et al., 2001; Siah et al., 2000; Anbazhagan et al., 1999]. Bis dato wurde die MSI beim Mammakarzinom unter vielen Gesichtspunkten betrachtet. Manche sehen die MSI mit einem frühen Stadium der Karzinogenese assoziiert [Ellsworth et al., 2005; Rosenberg et al., 1997], andere verbinden die MSI mit fortgeschrittenen invasiven Mammakarzinomen [Wild et al., 2004; Shen et al., 2000; Ben Yehuda et al., 2000]. Bei Caldes et al. korrelierten die MSI mit ER- und PR-Negativität beim sporadischen Brustkrebs [Caldes et al., 2000]. Dies steht den Ergebnissen von Chagpar et al. gegenüber [Chagpar et al., 2004]. Die MSI könnte außerdem eine Rolle in der Tumorprogression spielen [Toyama et al., 1996; Contegiacomo et al., 1995]; dies wurde in einer Studie näher untersucht, in der die MSI in einfachen dukталen Hyperplasien, DCIS, invasiven und metastasierten Mammakarzinomen analysiert wurden. Es konnte aber nicht bestätigt werden. Hingegen konnte hier eine Assoziation zwischen LOH und Tumorprogression hergestellt werden [Dillon et al., 1997]. Pizzi et al. fanden eine Korrelation der MSI mit steigender Tumorgröße, positivem LK-Status und fortgeschrittenem klinischen Stadium, sowie eine inverse Korrelation mit der Expression von p53 [Pizzi et al., 2002]. Die Tumorgröße und den LK-Status betreffend wurden später gegensätzliche Meinungen publiziert [Chagpar et al., 2004; Luqmani et al., 2003; Demokan et al., 2002]. Studien zur Beziehung der MSI zu BRCA1/2 ergaben, dass es hier, anders als vermutet, keine signifikante Assoziation gibt [Adem et al., 2003; van der Looij et al., 2001; Huiping et al., 1999].

Wild et al. haben die MSI an 39 Patientinnen mit fortgeschrittenem nodal-positivem Mammakarzinom nach HDCT/ASZT untersucht. Sie fanden eine MSI für mindestens drei Marker bei 13 Patientinnen (33%) und befand die MSI als prognostisch ungünstig und mit Resistenz gegenüber Chemotherapie assoziiert [Wild et al., 2004]. Murata et al. konnten zuvor in ihrer 32 Patientinnen umfassenden Studie in 47% eine MSI zeigen, die zusätzlich genetische und epigenetische Veränderungen der Mismatch-Repair-Gene hMLH1 und hMSH2 aufwiesen, und sah in der MSI einen Beitrag zur genetischen Instabilität und Tumorigenese beim sporadischen Mammakarzinom [Murata et al., 2002].

Im Gegensatz dazu steht die Studie von Adem et al. Sie untersuchte 34 Tumoren von 30 Patientinnen mit sporadischem sowie erblichem Brustkrebs auf ihre genetische Instabilität. Die MA konnte in keiner der Proben eine MSI nachweisen, auch das DCIS mit Verlust der hMLH1-Expression war mikrosatellitenstabil, was schließlich zur Annahme führte, dass DNA-Mismatch-Repair-Defekte mit Unterexpression von hMLH1 und hMSH2 beim sporadischen und familiären Brustkrebs extrem selten sind [Adem et al., 2003]. Auch Wild et al. konnten beim Mammakarzinom für die MSI-positiven Tumore keinen Verlust oder eine Verminderung der hMLH1- und hMSH2-Gene nachweisen [Wild et al., 2004]. Zudem veröffentlichten vor Kurzem Khilko et al. ihre Studie, in der ebenfalls keine Assoziation zwischen dem Verlust der Kernanfärbbarkeit für hMLH1 und hMSH2 und der MSI beim Mammakarzinom gefunden werden konnte. Sie folgerten daraus, dass diese beiden MMR-Gene beim Mammakarzinom wohl keine Rolle spielen würden [Khilko et al., 2007]. Die beim kolorektalen Karzinom entdeckte starke Korrelation zwischen dem MSI-H-Genotyp und der positiven IHC für hMLH1 und hMSH2 [Cai et al., 2004; Geisler et al., 2003; Halling et al., 1999] scheint es also beim Mammakarzinom nicht zu geben.

Die bisher größte MSI-Studie mit 267 Brustkrebspatientinnen, die alle histologisch wichtigen Entitäten untersuchte, fand in 104 Loci keinen einzigen MSI-Phänotyp. In über 10.000 Reaktionen konnten keine MSI nachgewiesen werden [Anbazhagan et al., 1999]; auch falsch-positive Befunde wurden nicht beobachtet.

In unserer Arbeit wurden 191 Mammakarzinome auf das Vorliegen des Instabilitätsphänotyps an 5 verschiedenen chromosomalen Loci überprüft. Eine MSI konnte dabei nur für 11 von 191 Karzinomen (5,8%) beobachtet werden. Es handelt sich also um eine geringe MSI-Häufigkeit im Vergleich zur Studie von Wild et al. [Wild et al., 2004]. Beide Studien fanden im gleichen Labor statt und die verwendeten Reagenzien waren identisch. Es wurden nur höchst sensitive Primer verwendet, die bereits in früheren Studien hohe MSI-Raten gezeigt hatten und auch unsere Studie wurde unter der Betreuung von Peter Wild durchgeführt. Bei

der Auswahl der Primer haben wir den Erfahrungswert und die Literaturanalyse zu Mikrosatellitenmarkern aus der Arbeit von Wild et al. verwendet. Dieser hatte dem Konsensus-Panel zur MSI-Analyse in kolorektalen Karzinomen entsprechend [Boland et al., 1998] nur höchst sensitive Primer selektiert, die bereits in früheren Studien hohe MSI-Raten gezeigt hatten. Das HNPCC-Konsensus-Panel selbst ergab keine verwertbare MSI-Detektion beim Mammakarzinom und musste entsprechend modifiziert werden.

Tab. 5.1: Zusammenstellung der MSI-Raten der in unserer Studie verwendeten Mikrosatelliten-Marker beim Brustkrebs (modifiziert nach Siah et al., 2000; ergänzend aufgeführte Primer **rot**)

Marker	Total %	n	Literaturangabe	Eigene Studie %
D11S988	17,7	124	Karnik et al., 1995; Vaurs-Barriere et al., 1998	0
TBP	0	61	Chappel et al., 1997	45,5
D18S51	43,5	23	Aldaz et al., 1995	45,5
D1S549^a	20,0	15	Rosenberg et al., 1996	9
D21S1436 (GGAA2E02)	13,9	115	Paulson et al., 1996; Benachenhou et al., 1999; Vaurs-Barriere et al., 1998	0

^anur bei atypischer Hyperplasie

Wie aus der Tabelle 5.2 hervorgeht, erzielten wir die besten Ergebnisse für die Primer TBP und D18S51. TBP ließ sich aus Erfahrung im Labor am besten amplifizieren und erwies sich in der Arbeit von Wild et al. mit einer MSI-Rate von 15,4% als guter Primer. D1S549 und D18S51 erwiesen sich in vorangegangenen Studien als sehr sensitiv für MSI-positive Tumoren [Rosenberg et al., 1996; Aldaz et al., 1995; Wild et al., 2004]. Lediglich die Erwartungen bezüglich D11S988 als informativsten Marker [Siah et al., 2000; Karnik et al., 1995; Vaurs-Barriere et al., 1998] konnten wir nicht bestätigen. Dabei wurde primär der TBP-Primer für jeden Tumor amplifiziert und die entsprechende Amplifizierbarkeit wurde im Folgenden als Knock-out-Kriterium für die weiteren Primer angewendet.

Ein letzter Gesichtspunkt ist die Prognostizität und Prädiktivität der MSI beim Mammakarzinom. Verschiedene Studien haben für MSI-positive Mammakarzinome eine ungünstigere Prognose postuliert [Zekri et al., 1999; Tomita et al., 1999; De Marchis et al., 1997; Paulson et al., 1996], konnten hierfür aber keine schlüssige Erklärung finden.

Paulson et al. zeigten bei der Analyse von 37 Brustkrebs-Patientinnen einen signifikanten Zusammenhang zwischen der MSI und den mit einer schlechten Prognose behafteten Faktoren, wie Lymphknotenstatus, mediane Tumorgöße, fortgeschrittenes Tumorstadium und Metastasierung. Dabei waren mindestens 30% (11/37) der Mammakarzinome in mehr als zwei Loci instabil und das EFS sowie das OS bei MSI-positiven Tumoren war univariat signifikant reduziert (siehe Tab. 5.3). Auch hier konnte kein Beweis dafür erbracht werden, dass die MSI einen unabhängigen Prognosefaktor für das OS darstellt.

Einen interessanten Beitrag leistete die Arbeitsgruppe um Tomita. Sie wies in 12 von 101 Fällen von Brustkrebs (11,9%) den RER-Phänotyp nach, und definierten als MSI, wenn mindestens drei der sieben Loci instabil waren. Dabei stellte sich heraus, dass die MSI-positiven Mammakarzinome im Vergleich zu MSI-negativen Fällen fortgeschrittenere Tumorstadien aufzeigten und gleichzeitig eine schlechtere Prognose hatten, d.h. 41,7% der MSI-positiven Tumore wurden als T4-Karzinome klassifiziert, 47,7% der MSI-negativen Tumore als T1-Karzinome. Zudem fand man eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Fernmetastasen und dem MSI-Status. Insgesamt war das OS bei den MSI-positiven Tumoren deutlich reduziert (siehe Tab. 5.3). Diese Ergebnisse untermauerten die bereits vorhandene Studie von De Marchis et al. und stehen mit den Ergebnissen von Wild et al. für einen negativen prognostischen Wert der MSI beim Mammakarzinom. [De Marchis et al., 1997; Wild, 2002]

Tab. 5.2: Literatur zur MSI beim Mammakarzinom mit prognostischer Signifikanz

Referenz	n	Überleben	Zeitspanne [Jahre]	MSI-Kriterien	Überlebensrate		Log Rank Test
					MSS	MSI	
Paulson et al., 1996	49	PFÜ	3	$\geq 2/11$ (18%)	0,35	0,78	0,050
		GÜ	3		0,47	0,87	0,020
Tomita et al., 1999	101	PFÜ	5	$\geq 3/7$ (43%)	NA		
		GÜ	5		0,49	0,86	< 0,01
Wild, 2002	39	PFÜ	2	$\geq 3/15$ (20%)	0,31 (8/26)	0,08 (1/13)	0,0214
		PFÜ	3		0,08 (2/26)	0,0 (0/13)	
		GÜ	2		0,69 (18/26)	0,23 (3/13)	0,0004
		GÜ	3		0,31 (8/26)	0,0 (0/13)	

NA: Daten nicht verfügbar; PFÜ: Progressfreies Überleben; GÜ: Gesamtüberleben

Zusammenfassend bleibt zu erwähnen, dass wir in unserer Studie weder die MSI bezüglich des Mammakarzinom als häufiges Ereignis, noch ihre prognostische Signifikanz bestätigen konnten. Eine mögliche Ursache für die hohe Diskrepanz zwischen unseren und Peter Wilds Ergebnissen liegt am hoch selektierten Patientenkollektiv. In einem, wie in unserer Studie, breit angelegtem Patientenkollektiv hingegen bleibt die MSI ein seltenes Ereignis. In Zusammenschau mit dem derzeitigen Stand der Forschung hat die MSI beim Mammakarzinom als Entität weder prädiktiven noch prognostischen Wert. Für spezielle Untergruppen beim Brustkrebs kann die MSI einen anderen Stellenwert besitzen. Dies bleibt in weiteren Studien zu untersuchen. In unseren Ergebnissen konnte keine Korrelation mit der IHC oder Sequenzierung von p53 gefunden werden. Auch die Prädiktivität und Prognostizität der MSI bezüglich EFS und OS ergab keine verwertbaren Aussagen. Die MA kann also im Hinblick auf die Untersuchung genetischer Veränderungen in fortgeschrittenen Mammakarzinomen nach

HDCT/ASZT nicht als Indikator für Therapieansprechen und Überlebensrate verwendet werden.

5.2.2.3 Tumorsuppressorgen p53

Das 1979 zunächst fälschlicherweise als Onkogen beschriebene p53 gilt als das erste entdeckte Tumorsuppressor-Gen. Es stört die Proliferation von abnormen Zellen und verhindert so die Entwicklung von Neoplasien. Unter normalen zellulären Bedingungen hat p53 eine Wächterfunktion, dessen Aktivierung durch zellulären Stress, wie z.B. DNA-Veränderungen, Aktivierung von Onkogenen etc., vermittelt wird. Das Protein fungiert dann als Transkriptionsfaktor, der die Expression vieler Gene unterschiedlicher Funktion kontrolliert [Bertheau et al., 2007]. Auf diese Weise übt es eine Reihe tumor-supprimierender Funktionen aus: Unterbrechung des Zellzyklus, Vermittlung von Apoptose, DNA-Reparatur sowie Inhibition von Angiogenese und Metastasierung [Gasco et al., 2002]. Die Inaktivierung von p53 wird als Schritt in der Entstehung von Neoplasien betrachtet, wobei die Häufigkeit von Mutationen im p53-Gen mit etwa 50% bei allen Neoplasien und etwa 20 - 30% beim Brustkrebs als Entität angegeben wird [Langerød et al., 2007]. Interessanterweise steigt die Häufigkeit bei nodal-positiven Patienten an [Overgaard et al., 2000].

Mammakarzinome mit p53-Mutation haben bekannterweise eine schlechte Prognose. In einer Übersichtsarbeit von Hartmann et al. wurde schon sehr früh die Assoziation von Mutationen des p53-Gens mit einer schlechten Prognose und einem herabgesetzten Ansprechen auf Chemotherapie dargestellt [Hartmann et al., 1997]. Der prognostische und prädiktive Stellenwert der p53-Expression wurde in einer Metaanalyse von mehr als 9000 Patienten mittels IHC untersucht und als schwach befunden [Barbareschi, 1996]. Hingegen konnte in mehr als 25 Studien, die über 6000 Patienten einschlossen, eine starke Signifikanz der p53-Mutationen nachgewiesen werden [Übersicht in Børresen-Dale, 2003]. Eine Metaanalyse von 16 dieser Studien umfasste 3500 Patienten [Pharoah et al., 1999] und bestätigte, dass Mutationen in p53 unabhängig von anderen Risikofaktoren mit einem schlechteren EFS und OS beim Brustkrebs assoziiert sind. Die Studie von Langerød et al. hat den prognostischen Stellenwert von p53 und der Genexpressionsprofile an 212 Patienten untersucht, wobei die p53-Mutationen sequenziert und die Expressionsprofile mittels cDNA-Microarray-Technik ermittelt wurden. Dabei stellten sich neben dem LK-Status die Tumorgöße und der p53-Status als höchst signifikante Faktoren heraus. Patienten mit p53-Mutation hatten eine 4-fach erhöhte Sterblichkeit gegenüber Patienten ohne Mutation in der univariaten sowie in der multivariaten Analyse. Bei den Tumoren, welche in die entsprechenden Genexpressionsprofile eingeteilt wurden, fanden sich 17 von 20 p53-Mutationen in den basal-like und Her-2/neu+Gruppen, was die Differen-

zierung des Effekts von p53 und dem der Genexpressionsgruppen erschwert [Langerød et al., 2007].

Die derzeit größte Studie sequenzierter, somatischer Genmutationen von p53 beim Mammakarzinom umfasst 1794 Patienten mit einer Nachbeobachtungszeit von mindestens 10 Jahren, wobei nur Mutationen in Exon 5-8 miteinbezogen wurden. Die Mehrzahl der Patientinnen hatte invasive duktale Karzinome ohne LK-Beteiligung und positiven HR-Status. P53-Mutationen waren signifikant häufiger in dukталen und medullären Karzinomen, sowie in jüngeren Patientinnen (< 60 Jahre) anzutreffen und signifikant mit einem aggressiven Phänotyp (Tumoren höheren Grades, größerer Ausdehnung, nodal-positiv und niedrigem Hormonrezeptor-Status) assoziiert. Die Mutationen waren mit einer erhöhten Brustkrebs-spezifischen Mortalität von 2,27 (relatives Risiko > 10 Jahre; $p < 0,0001$) verbunden. PR-Tumoren ohne p53-Mutation wiesen zudem eine 2-fach erhöhte Brustkrebs-spezifische Mortalität auf. Patientinnen mit p53-Mutation und sonst prognostisch positiven Faktoren (niedriger Grad, begrenzte Größe, nodal-negativ und HR-positiv) hatten ein fast um 60% kürzeres OS verglichen mit denen ohne Mutation. Der prognostische Wert des p53-Status war also unabhängig von den Faktoren Tumorgröße, -grad, LK-Status, und HR-Status. Exon 2-4 und 9-11 wurde nur für einen Teil der Tumoren sequenziert. Die Ergebnisse hieraus lassen aber einen noch größeren prognostisch negativen Wert unter Berücksichtigung aller Exons erahnen [Olivier et al., 2006]. Uneinigkeit herrscht v.a. über die prädiktive Eigenschaft des p53-Status. In der Vergangenheit ging man davon aus, dass der p53-Status nicht als prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie verwendet werden kann [Bsp.: Elledge & Allred, 1998]. Zu bemerken ist, dass die Meisten dieser Studien auf Untersuchungen der Expression von p53 mittels IHC basierten. Immunhistochemisch werden aber nur Mutationen entdeckt, die die Akkumulation von Proteinen bewirken, frameshift-, nonsense- und splice-Mutationen werden jedoch übersehen [Langerød et al., 2007]. Nicht alle Mutationen kodieren ein immunhistochemisch messbares Protein. Demgegenüber kann der Wildtyp p53 in manchen Tumoren akkumulieren und somit ein falsch-positives Ergebnis in der IHC bewirken [Lacroix et al., 2006]. In der Studie von Langerød et al. wurden in der IHC mehrere missense-Mutationen mit hohem Grad an mRNA-Expression übersehen, was die Unzulänglichkeit dieser Technik zum Screening nach Mutationen zeigt. Die Analyse mittels Gelelektrophorese und anschließender Sequenzierung der Mutationen erscheint als weit verlässlicher [Langerød et al., 2007]. Aktuellere Studien konnten auch mittels IHC Prädiktivität der p53-Expression zu verschiedenen Fragestellungen nachweisen. So zeigten Hieken et al. p53 als prädiktiv für einen Rückfall bei Patienten mit DCIS [Hieken et al., 2007]. De Roos et al. fanden in ihrer Studie eine Prädiktivität von

p53 bezüglich des Lokalrezidivrate für alle Stadien des duktalen Mammakarzinoms [de Roos et al., 2007]. Zwei Studien stellten getrennt voneinander p53 als signifikanten molekularen Marker heraus, der ein Nichtansprechen HR+Tumore auf eine endokrine Therapie voraussagt [Kai et al., 2006; Yamashita et al., 2006]. Dennoch bleibt festzuhalten, dass die Sequenzierung der IHC überlegen ist. Zum einen können auch Mutationen außerhalb von Exon 5-8 nachgewiesen werden. In der Studie von Andersson et al. lagen 18% der p53-Mutationen außerhalb von Exon 5-8, bei Langerød et al. waren es 15% [Andersson et al., 2005; Langerød et al., 2007]. Zum anderen ist es von Bedeutung, in welchem Abschnitt sich die Mutationen befinden. Interessanterweise wurde entdeckt, dass Mutationen, die Aminosäuren in den DNA-bindenden Regionen betreffen, einen aggressiveren Krankheitsverlauf zeigen, wohingegen Null-Mutationen oder andere missense-Mutationen mit einem intermediären klinischen Verlauf assoziiert sind [Gasco et al., 2002; Børresen-Dale, 2003]. Begründet scheint dies darin, dass Missense-Mutationen in diesen Regionen zu einem generellen Verlust der Transaktivierungskapazität von p53 führen, wohingegen missense-Mutationen außerhalb dieser Regionen die transkriptionelle Aktivität auf verschiedene Promotoren unbeeinflusst lassen (Resnick et al., 2003; Kato et al., 2003). Lai et al. schlossen daraus, dass zur Verwendung des p53-Status als Prognosefaktor das volle Spektrum der p53-Mutationen (z.B. verschiedene Typen, Lokalisationen, Anzahl) sequenziert werden muß [Lai et al., 2004].

In unserer Studie haben wir die Proben sequenziert und die Ergebnisse dann mit der IHC verglichen. Wir konnten eine sehr hohe Korrelation zwischen der p53-Immunhistochemie und der Sequenzanalyse feststellen. Dies ließ sich sowohl für die p53-Mutationen beweisen, die wir validieren konnten ($p = 0,010$), als auch für die nicht-validierten ($p < 0,001$). Da entsprechende Ergebnisse aus ähnlichen Studien hervorgehen [Wild et al., 2004; Valgardsdottir et al., 1997], kann davon ausgegangen werden, dass sich beide Verfahren dazu eignen, den p53-Status zu ermitteln.

Weiterhin konnten wir eine signifikante Korrelation zwischen der HER-2/neu- Überexpression und dem p53-Status herstellen [$p = 0,071$ (validiert); $p < 0,001$ (nicht validiert)]. Dies ist insofern interessant, da dieser Zusammenhang auch in anderen Arbeiten nachgewiesen wurde. Sørlie et al. fanden, dass p53-Mutationen viel häufiger in den basal-like und Her-2/neu+ als in den luminal-like Tumoren vorkommen (82%, 71% und 31%), wobei gut differenzierte Tumoren nur selten p53-Veränderungen aufweisen (13%) [Sørlie et al., 2001]. Die Korrelation der p53-Mutationen mit den Her-2/neu+Tumoren konnte in vielen Studien demonstriert werden [Feki & Irminger-Finger, 2004; Bull et al., 2004; Rahko et al., 2003; Yamashita et al., 2004]. Der Aspekt der Häufung von p53- Mutationen in den Subtypen Her-2/neu (70% = 7/10) und

basal-like (83% = 10/12) sollte in weiteren Studien beleuchtet werden. Hauptaugenmerk sollte hierbei darauf gelegt werden, ob sich hier die p53-Mutation als Effektorkomponente verhält oder als Ergebnis anderer Effektoren bei diesen Subtypen gesehen werden muss. Zusätzlich stieg die Anzahl der Mutationen erwartungsgemäß mit dem histologischen Grad [$p = 0,15$ (validiert); $p < 0,001$ (nicht validiert)] und war signifikant mit einer erhöhten Proliferation assoziiert ($p = 0,018$ (validiert); $p < 0,001$ (nicht validiert)), sprich mit einem aggressiveren Phänotypen verbunden.

Schon lange wird p53 als prädiktiver Faktor für das Überleben nach HDCT/ASZT diskutiert. Die Studien hierzu gehen von einem Trend zu schlechterem Outcome bei p53-Mutation [Somlo et al., 2002], bis hin zur Behauptung, dass p53 der stärkste prädiktive Faktor für ein kürzeres Überleben in diesem Setting sei [Hensel et al., 2002]. Nieto et al. konnten zuvor keine Prädiktivität von p53 in ihrer Studie nachweisen [Nieto et al., 1999]. Die kürzlich erschienene Studie von Kröger et al. bezieht sich, wie die vorliegende, auf HRBC-Patienten mit ≥ 10 pos. LK, jedoch wurde der p53-Status immunhistochemisch erhoben. Außerdem unterschieden sich die Chemotherapie-Schemata. Hier wird ein Trend zum Benefit der Patienten mit p53-Mutation an der HDCT/ASZT demonstriert [Kröger et al., 2006]. Andersson et al. konnten in ihrer Studie den Trend zu einem schlechteren Überleben von Patientinnen mit p53-Mutation bei adjuvanter Therapie mit CMF herausstellen [Andersson et al. 2005]. Zudem zeigen Tumore mit p53-Mutation ein gutes Ansprechen auf Mitosespindelgifte wie beispielsweise Mitoxantron, das in der HDCT verwendet wurde. Die Ergebnisse sind also in diesem Kontext zu betrachten. In unserer Studie konnten wir keinen signifikanten Unterschied im Überleben in Bezug auf den p53-Status feststellen. Es war allerdings ein Trend im Gesamtüberleben erkennbar, der eine schlechtere Prognose bei vorhandener p53-Mutation zeigte. 18 Ereignisse (46%) bei Patientinnen mit Mutation stehen 41 Ereignissen (38%) bei Patientinnen ohne Mutation gegenüber ($p = 0,49$). Es gab keine Korrelation des p53-Status mit der HDCT. Ein Unterschied im Ansprechen konnte in unserem Patientenkollektiv also nicht gefunden werden.

Insgesamt ist festzuhalten, dass der p53-Status derzeit nicht als prädiktiver Faktor für die HDCT beim Mammakarzinom zur Verfügung steht. Die Problematik der Erhebung des p53-Status sowie der angedeuteten Gültigkeit von Prognostizität und Prädiktivität für bestimmte Patientenkollektive muss zu diesem Thema diskutiert werden. Es erscheint vor allem schwierig die entsprechenden Patientenkollektive zu identifizieren, auf die der p53-Status angewandt werden kann.

Es ist schwierig, den p53-Status korrekt mittels standardisierter DNA-Sequenzanalyse zu evaluieren [Soussi et al., 2006]. Einen anderen Weg zur Analyse des p53-Status zeigen uns Takahashi et al. [2008] auf. Sie haben ein Genset identifiziert, welches die Expressionssignatur des p53-Status determiniert und das Genexpressionsprofil mit dem klinischen Outcome korreliert. Damit haben sie ein System entwickelt, das den p53-Status mit einer Genauigkeit von 83% im Test und 95% in der gesamten Studie voraussagen konnte. Es konnte sowohl EFS als auch OS der Patienten mit frühem Brustkrebs signifikant voraussagen ($p < 0,0001$) und konnte die p53-Signatur damit als einen starken und unabhängigen prädiktiven Faktor für das Outcome bei frühem Brustkrebs demonstrieren.

Ein letzter Punkt betrifft die mit dem p53-Status eventuell verbundene Resistenz gegenüber bestimmten Therapien. Ob die schlechte Prognose von Tumoren mit p53-Mutationen an einer aggressiveren Eigenschaft des Tumors liegt oder an einer damit verbundenen Therapieresistenz, ist aktuell unklar. Die Inaktivierung von p53 scheint die Sensitivität gegenüber bestimmten Agenzien zu bewirken, hingegen aber die Resistenz gegenüber anderen zu erhöhen [Bunz et al., 1999]. In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch der Strahlen- oder Chemotherapie induzierte Zellzyklusarrest und die Apoptose von einem funktionierenden p53 abhängt.

Speziell beim Mammakarzinom korrelieren spezifische p53-Mutationen mit dem Ansprechen auf Chemotherapie. Als Beispiel konnte für Doxorubicin [Aas et al., 1996; Geisler et al., 2001] eine Resistenz und für Paclitaxel [Kandioler-Eckersberger et al., 2000] eine Sensitivität jeweils verbunden mit einer spezifischen p53-Mutation gezeigt werden. p53-Mutationen, speziell solche die in den DNA-bindenden Domänen lokalisiert sind, scheinen also eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zu besitzen mit Ausnahme der Mitosespindelgifte [Lacroix et al., 2006].

Neue Therapiekonzepte, die es ermöglichen, die Funktion von p53 zu reaktivieren, könnten einen großen Schritt in der Onkologie bedeuten. Das Molekül MIRA-1 vermag es, in vitro die DNA-Bindung im mutierten p53 zu reaktivieren und seine Funktion in lebenden Zellen wiederherzustellen. Sein Strukturanalogen MIRA-3 zeigt eine antitumorale Aktivität in vivo gegenüber Tumor-Xenografts mit menschlicher p53-Mutation in SCID-Mäusen [Bykov et al., 2005b]. Demgegenüber könnten Therapieverfahren bei einem ausgewählten Kollektiv durch die Inaktivierung von p53 die Tumoren sensibel gegenüber Agenzien wie Paclitaxel oder Mitosespindelgiften machen. Eine Inaktivierung von p53 könnte auch die durch Chemotherapie oder Radiotherapie induzierte Apoptose geschädigter Zellen verhindern. Das Molekül Pifithrin- α inhibiert die p53-Funktion [Gudkov & Komarova, 2003 u. 2005], scheint aber in

seiner Löslichkeit begrenzt zu sein [Gary & Jensen, 2005]. Weitere Erkenntnisse auf diesem Gebiet könnten die Landschaft der Chemotherapeutika revolutionieren.

Derzeit findet der p53-Status in der Routine-Analyse noch keine Verwendung, obwohl sich Beweise für seinen prognostischen Stellenwert mehren. Die Suche nach Mutationen mittels PCR und Gelelektrophorese mit anschließender DNA-Sequenzierung gilt als Goldstandard für den Nachweis genomischer Veränderungen, sind jedoch aufwendig, teuer und damit nicht für die klinische Anwendung geeignet. Es gibt neue Techniken, die sich besser für die Routinediagnostik eignen, wie die Microarray-basierten Methoden. Wenn sich diese Verfahren kostengünstig anwenden lassen, könnte der p53-Status zu einem wichtigen Faktor im klinischen Alltag werden.

Schließlich ist zu sagen, dass die derzeitigen Kriterien zur Risikoevaluation, wie die St. Gallen Konferenz oder der Nottingham prognostic index (NIH) nicht ausreichend sind, um vorzusagen, welche Brustkrebs-Patienten ein hohes Risiko bezüglich Rückfall und Sterblichkeit haben.

Wir sind daher der Meinung, dass der p53-Status ein starker Prognosefaktor in Hinsicht auf einen ungünstigen Krankheitsverlauf ist und seine Prädiktivität bezüglich des Ansprechens einer bestimmten Therapie in grösseren Studien für bestimmte Subgruppen näher untersucht werden muss.

5.2.2.4 Karyopherin α_2 (KPNA2)

Wie einleitend bereits beschrieben handelt es sich bei KPNA2, um ein molekulares Markerprotein aus der Gruppe der Karyopherine, welches als Adapterprotein eine Rolle im nukleozytoplasmatischen Transport spielt. Eine der Aufgaben des Importproteins KPNA2 ist die Internalisierung von NBS1 in den Zellkern. NBS1 fungiert als Tumorsuppressor, indem es die genomische Integrität im Zellkern schützt, besitzt aber wohl auch eine mit dem PI3-Kinase/AKT-Aktivierungspfad assoziierte onkogene Funktion im Zytoplasma. [Teng et al., 2006] Es ist ein Regulator des MRE11/RAD50/NBS1-(MRN)-Komplex [Carney et al., 1998; Trujillo et al., 1998; Paull und Gellert, 1999]. Der MRN-Komplex detektiert Brüche und aktiviert eine DNA-Reparatur [Stracker et al., 2004]. KPNA2 interagiert nun mit NBS1 und führt somit zur Internalisierung des MRN-Komplexes in den Zellkern [Tseng et al., 2005]. Der MRN-Komplex (Mre11, Rad50, und Nbs1) arbeitet als Sensor für DNA-Brüche und fungiert als Aktivator von sog. Checkpoints für DNA-Schäden im Zellzyklus. Zusätzlich beeinflusst er die DNA-Reparatur mittels Rekombination zwischen Schwesterchromatiden [Stracker et al., 2004]. Ein vermehrtes Vorkommen von KPNA2 in einer Zelle könnte demnach als ein Zeichen erhöhter genomischer Instabilität interpretiert werden. Das erhöhte Vorkommen könnte

daraus resultieren, dass im Genom vermehrt Doppelstrangbrüche vorliegen und somit ein erhöhter Bedarf an Reparaturtätigkeit besteht, welcher aber nicht ausreichend gedeckt werden kann. Möglich wäre es auch, dass es durch unzureichende Funktion der Reparaturmechanismen zu einer Häufung von Doppelstrangbrüchen kommt und die gesteigerte Einschleusung des MRN-Komplexes durch KPNA2 ins Leere läuft. In beiden Fällen käme es zu einer gesteigerten genomischen Instabilität der betroffenen Zelle, was eine eventuelle Assoziation von KPNA2 mit entarteten Zellen erklären würde. Bereits in Studien nachgewiesen wurde die Verknüpfung von Veränderungen des MRN-Komplexes mit dem Auftreten von Mammakarzinomen [Hsu et al., 2007; Heikkinen et al., 2006].

Dankof et al. haben die KPNA2-Expression beim Mammakarzinom in verschiedenen Stadien, ausgehend von fortgeschrittenen Tumoren hin zu duktalem Carcinomata in situ (DCIS) und benignen Brusttumoren untersucht. Dabei konnte eine signifikante Korrelation zu fortgeschrittenen Tumorstadien, positivem LK-Status, höherem Tumorgrad und negativem ER-Status nachgewiesen werden. Eine nukleäre KPNA2-Expressivität von mindestens 10% wurde als positiv gewertet. Bei 83 untersuchten Patientinnen war das EFS für die KPNA2-positiven Tumoren (31,33%) mit durchschnittlich 69 Monaten um 49 Monate signifikant kürzer als bei KPNA2-Negativität ($p = 0,007$). Die KPNA2-Expression nimmt also vergleichend zu den Ergebnissen von Dahl et al. mit dem Fortschreiten der Tumorerkrankung zu [Dankof et al., 2007; Dahl et al., 2006]. In unserer Studie handelt es sich um Hochrisiko-Brustkrebs-Patientinnen, dh. Patientinnen in einem fortgeschrittenen Stadium und somit in Anlehnung an die beiden genannten Studien genau das Patientenkollektiv, das eine positive KPNA2-Expressivität zeigen dürfte.

In unserer Studie untersuchten wir den Effekt der Expression von KPNA2 auf den Zusammenhang mit einem schlechten Outcome im Patientenkollektiv der randomisierten WSG-AM-01-Studie. Wir konnten eine positive KPNA2-Expression ($\geq 10\%$ der Zellkerne) in 39,3 % der Primärtumore nachweisen. Schon in vorangegangenen Studien wurde von einer positiven KPNA2-IHC in 31,3% bei Patientinnen mit invasivem Brustkrebs berichtet [Dahl et al., 2006]. Das höhere Ergebnis geht wahrscheinlich auf eine spezielle Selektion von nodal-positiven Hochrisiko-Patientinnen zurück. Die KPNA2-Expression im Kern war signifikant mit aggressiven Tumoreigenschaften assoziiert, wie fortgeschrittenem Tumorstadium, negativem Hormonrezeptor-Status, Her-2/neu-Expression, positiver EGFR- und p53-Überexpression. Die Daten ergaben, dass die KPNA2-Positivität auf einen aggressiven Brustkrebs-Phänotypen hinweisen könnte, auch bei den ausgewählten HRBC-Patientinnen. Die Assoziation mit negativem Hormonrezeptor-Status und positivem Her-2/neu, EGFR und p53

lässt für möglich erscheinen, dass die KPNA2-Überexpression mit der festgelegten molekularen Klassifikation von Brustkrebs korreliert [Hensel et al. 2002; Perou et al., 2000]. Es wurden bereits mehrere Gene entdeckt, deren Expression oder Veränderung sich auf die Prognose beim Mammakarzinom auswirkt [Sotiriou et al., 2007]. Bei der Erhebung dieser Daten wurden verschiedene Arrays, statistische Methoden, Kriterien für die Auswahl der Patientinnen und die Wertung verwendet. Nur wenige überlappende Gene konnten identifiziert werden, während aber ähnliche Wirkmechanismen dargestellt werden konnten. Sørlie et al. fanden intrinsische molekulare Brustkrebs-Subtypen auf der Basis der Ursprungszelle (luminal, basal oder Her-2/neu) mit schlechtem klinischen Outcome der basal-like und Her-2/neu-Subtypen verglichen mit den luminalen Subtypen assoziiert. In dieser Studie wurden 85 cDNA-Mikroarrays (78 Mammakarzinome, 3 Fibroadenome und 4 Normalgewebe der Brust) untersucht und dabei eine Unterteilung in ER+ und ER–Tumoren vorgenommen. Weiterhin wurden dann die ER+ in die Subtypen Luminal-A,B,C und die ER–in Basal-like, Erbb2+ (Her2/neu+) und Normal-Breast-like-Tumoren eingeteilt. Die Untersuchung des TP53-Status der Tumoren ergab eine signifikant höhere Mutationsrate mit 71% (5/7) für die Her2/neu+ und 82% (9/11) für die Basal-like-Subtypen im Gegensatz zu nur 13% beim Luminal-A-Subtypus ($p < 0,001$, 2-seitig). Schon in vorangegangenen Studien standen hohe TP53-Mutationsraten für eine schlechte Prognose und waren mit geringem Ansprechen gegenüber systemischen Therapien assoziiert [Børresen et al., 1995; Bergh et al., 1995; Aas et al., 1996; Berns et al., 2000]. In der Studie von Sørlie et al. konnte für die Her2/neu+ und die Basal-like-Tumoren ein signifikant kürzeres EFS und OS im Vergleich zu den anderen Subtypen festgestellt werden ($p < 0,01$). Die ER–Tumoren mit der Unterklassifizierung in Her2/neu+ und Basal-like-Tumoren konnten als eine besonders aggressive Unterform des Mammakarzinoms dargestellt werden [Sørlie et al., 2001].

Die Ergebnisse zur Genexpression wurden in der IHC beim nodal-positiven Mammakarzinom unter Verwendung von 24 Markern und k-clustering bestätigt. Basal-like und Her-2/neu Subtypen waren dabei unabhängig von der Behandlung mit einer schlechteren Prognose assoziiert als luminalen Subtypen, die für viele Marker negativ waren [Diallo-Danebrock et al., 2007].

In unserer gegenwärtigen Studie konnten wir eine signifikante Assoziation zwischen der KPNA2-Expression und den basal-like und Her-2/neu Subtypen demonstrieren. Interessanterweise wurde eine Hochregulation von KPNA2 in verschiedenen Studien zur Genexpression beim Mammakarzinom gefunden.

Ein kontrolliertes Clustern zum Überleben der Patientinnen in der Studie von Sørlie et al. ergab schließlich eine Reihe von 264 cDNA Klonen, welche dann in eine hierarchische Clus-

ter-Analyse eingingen. Das daraus resultierende Diagramm zeigte, dass fast alle der ausgewählten 264 cDNA Klone in die drei Haupt-Genexpressions-Cluster fielen: das luminal/ER-positive cluster, das basal-epitheliale Cluster und das Proliferations-Cluster. Interessant war, dass KPNA2 stark in Tumoren des Proliferations-Clusters vertreten war; z.B. war KPNA2 in der Gruppe der Tumoren mit dem kürzesten OS und EFS in einer Studie von Wang et al. zugleich als Regulationsgen charakterisiert worden und wurde dann unter die 76 Gene aufgenommen, deren Expression oder Veränderung die Prognose von unbehandelten nodal-negativen Patientinnen beschreibt [Wang et al., 2005]. Auch bei anderen Tumoren konnte die KPNA2-Expression mit einer schlechten Prognose assoziiert werden, z.B. beim Melanom [Winnepenninckx et al., 2006].

In einer TMA-Studie unselektierter Brustkrebs-Patientinnen haben Dahl et al. gezeigt, dass die KPNA2-Immunreaktivität besonders bei nodal-positiven Patientinnen einen unabhängigen negativen Prognosefaktor für das OS darstellt [Dahl et al., 2006].

Die Ergebnisse von Dahl et al. bezüglich der prognostischen Relevanz der KPNA2-Expression konnten in unserer hoch selektierten Kohorte von HRBC- Patientinnen mit multiplen positiven Lymphknoten bestätigt werden. Eine positive KPNA2-Anfärbbarkeit war in univariater Analyse signifikant mit kürzerem EFS und OS assoziiert. In der multivariaten Analyse stellten sich lediglich Hochdosis-Therapie, Tumorgroße ≥ 3 cm, hoher Ki-67 labeling index und die molekulare Klassifikation als unabhängige prognostische Faktoren für das EFS heraus. Im Gegensatz dazu zeigte sich die KPNA2-Expression als signifikanter Parameter für ein kürzeres OS bei konventioneller Therapie und einer Tumorgroße ≥ 3 cm.

Sotiriou et al. untersuchten, ob der histologische Grad mit dem Genexpressionsprofilen bei Brustkrebs assoziiert sei und ob diese dafür verwendet werden könnten, das histologische Grading zu verbessern [Sotiriou et al., 2006]. Beim Vergleich der Expressionsprofile von Tumoren zwischen histologischem Grad 1 und 3 fand sich KPNA2 als eines der stark überexprimierten Gene, die mit einem höheren histologischen Grad assoziiert waren. Schlussfolgernd ergab sich, dass mittels einer Unterteilung der Grad 2-Tumore auf Basis der Genexpression in zwei Gruppen höherer und niedrigerer Rezidivrate die Genauigkeit des histologischen Tumorgradings sowie sein prognostischer Wert verbessert würden. In unserer TMA-Studie waren die KPNA2-Expression und hoher Tumorgrad signifikant ko-assoziiert ($p < 0,001$). Die Analyse der Untergruppen zeigte den negativen prognostischen Effekt der KPNA2-Expression nur für G2-, nicht aber für G3-Tumoren. Somit könnte die KPNA2-IHC zur Diagnose genutzt werden. Vor allem in der G2-Subgruppe zeigte sich wie bei Sotiriou et al. eine schlechte Prognose.

Nukleozytoplasmatische Transportvorgänge spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen Zellfunktionen wie Signaltransduktion, Regulierung von Genexpression und Zellzyklus. Es liegt nahe, dass diese Mechanismen als Schlüssel für maligne Transformation fungieren. KPNA2 stellt ein Adaptor-Protein dar, welches die Aufnahme von Proteinen mit Zellkern-Lokalisationssignal in den Nukleus bewirkt. Außerdem hält es eine Schlüsselfunktion im nukleozytoplasmatischen Transport inne, indem es durch Interaktion mit dem NBS1-Komplex (Nijmegen breakage Syndrom) einen Import von Signalmolekülen in den Zellkern und eine Ausschleusung von Effektormolekülen ins Zytoplasma bewerkstelligt [Teng et al., 2006]. Bisher ist noch unklar, ob KPNA2 über verschiedene Mechanismen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielt. Es fungiert beispielsweise als Transporter mehrerer Tumorsuppressoren, wie CHK2 [Zannini et al., 2003], und NBS1 [Tseng et al., 2005]. Es konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass NBS1 mit c-myc interagiert, was zu einem aggressiven, hyperproliferativen malignen Phänotypen führt [Chiang et al., 2003]. Chen et al. berichteten, dass das onkogene Potential von NBS1 durch eine PI3-Kinase-Aktivität in Verbindung mit einer Aktivierung von Akt vermittelt wird [Chen et al., 2005]. Durch die Beeinflussung der zellulären Lokalisation von NBS1 kontrolliert KPNA2 seine Funktion als DNA-Reparaturprotein oder Aktivator des PI-3/Akt pathways. Es gibt Hinweise darauf, dass die Effektoren sowohl der ATM-Kinase als auch der Schnittstellen des Zellzykluses (NSB1 und CHK2) von KPNA2 reguliert werden. Die starke Korrelation zwischen der Expression von KPNA2 und der Anfärbbarkeit für Ki-67 sowie der unabhängige prognostische Effekt in unserer Studie weisen auf eine zentrale Rolle von KPNA2 in Signalgebung zur Proliferation beim Brustkrebs hin.

Ein weiterer Vertreter der Familie der Importproteine, das Karyopherin α_1 (KPNA1), ist am nukleären Transport von BRCA1 beteiligt, dessen Mutationen oft mit basal-like-Tumoren, Her-2/neu-Überexpression und p53-Mutationen assoziiert sind [Lakhani et al., 2002], was möglicherweise seine Rolle in der Induktion eines aggressiven Phänotyp des Mammakarzinoms erklärt.

Tseng et al. konnten zeigen, dass eine Supprimierung von KPNA2 zu einer Inaktivierung von Doppelstrangbrüchen (z.B. in Folge ionisierender Strahlung) und zu einer Unterdrückung von NBS vermittelter DNA-Reparatur führt. Interessanterweise wird BRCA1 auch mittels KPNA2 zum Zellkern transportiert [Thakur et al., 1997], was eine Verbindung zwischen der KPNA2-Expression und dem Mammakarzinom herstellt. Die Funktion von BRCA1 in der DNA-Reparatur und an Zellzyklus-Schnittstellen lässt eine Sensitivität gegenüber DNA-schädigender Agentien wie Cisplatin oder Alkylanzien erahnen, welche in unserer Studie zur Dosisintensivierung verwendet wurden. Die Lokalisation von BRCA1 hängt auch von der

normalen p53-Funktion ab, so bedarf der DNA-Schaden assoziierte Export von BRCA1 aus dem Zellkern des p53-Wildtyps [Feng et al., 2004]. Kim et al. wiesen eine signifikante Korrelation einer intakten KPNA2-Expression mit nukleärer Lokalisation von p53 und seiner Funktion als Tumorsuppressor nach [Kim et al., 2000]. Unsere vorangegangenen Untersuchungen zeigten den stärksten Benefit einer HD-Therapie besonders in der Untergruppe junger Patientinnen mit dreifach negativen Tumoren (ER/PR/Her-2/neu) [Nitz et al., 2006], welche zugleich häufig BRCA1- und p53-Mutationen hatten.

Ein kürzeres Überleben der KPNA2-positiven Patientinnen unserer Studie in beiden Gruppen weist darauf hin, dass ein abnormer Transport von BRCA1 infolge der hohen KPNA2-Expression in Tumoren ohne p53-Wildtyp wahrscheinlich zu inkorrekturer DNA-Reparatur und vermindertem Ansprechen auf Alkylantien- und Anthrazyklin-basierte Therapieschemata ungeachtet der Dosisintensität führt.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass die prognostische Relevanz nukleärer KPNA2-Expression in einer randomisierten Kohorte von Patientinnen mit HRBC bestätigt werden konnte und sich die KPNA2-Expression dabei als unabhängiger negativ prognostischer Faktor für EFS und OS ungeachtet der Therapieintensität erwies. Die KPNA2-Überexpression war signifikant mit den basal-like- und Her-2/neu-Brustkrebs-Untergruppen assoziiert. Die Korrelation der nukleären KPNA2-Expression mit einer geringeren Überlebensrate besonders bei HRBC-Patientinnen mit mäßig differenzierten Tumoren (G2) gibt uns die Möglichkeit, Patientinnen mit einem schlechten Outcome, aber guten Ansprechraten auf eine Hochdosis-Chemotherapie auf dem Boden einer routinierten chirurgischen Pathologieerhebung zu identifizieren.

5.3 Perspektiven für die Onkologie

Der Krankheitsverlauf beim Mammakarzinom kann bei gleichem Krankheitsstadium dennoch sehr weit variieren. Die stärksten Prädiktoren einer Metastasierung, wie Lymphknotenmetastasierung und histologischer Differenzierungsgrad, sind zur exakten Klassifizierung der Mammakarzinome entsprechend ihrem klinischen Verhalten ungeeignet [Mc Guire, 1991; Goldhirsch et al., 1998; Eifel et al., 2001]. Obwohl Chemotherapie und Hormontherapie das Risiko der sekundären Metastasierung in ca. einem Drittel der Fälle herabsetzen, erweisen sich etwa 70-80% dieser Behandlungen im Nachhinein als unnötig [Anonymous, 1998a; ebd., 1998b].

Ein Ansatz wäre es, die nukleäre KPNA2-Expression als unabhängigen negativen prognostischen Faktor für EFS und OS im Setting der G2-Tumore beim metastasierten

Mammakarzinom zu nutzen. Dies könnte dazu beitragen, das Ansprechen bestimmter Patienten auf eine Hochdosis-Chemotherapie vorauszusagen.

Weil die vorhandenen Geweberesourcen von Patientinnen mit dokumentierten Daten aber meist sehr begrenzt und schnell aufgebraucht sind, wurden sog. Tissue-Arrays zur kombinierten Gewebeanalyse vieler Kandidatengene zahlreicher Tumorproben entwickelt, [Kallioniemi et al., 2001; Nocito et al., 2001], wobei hier mehrere Tumorproben in einen Paraffinblock gebettet werden. Die Arrays stehen dann für verschiedene *in situ*-Methoden zur Validierung differentiell exprimierter Targetgene zur Verfügung, wie Immunhistochemie, Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und mRNA-*in situ*-Hybridisierung. Mittels dieses Verfahrens müsste auch die Evaluation der KPNA2-Expression möglich sein.

Seitdem man die für eine hereditäre Krebsdisposition verantwortlichen Gene identifiziert und isoliert hat, besteht das Bestreben der Medizin darin, auf molekularer Ebene prädiktive und prognostische Faktoren zur Therapiewahl sowie spezielle Therapieansätze zu entwickeln. Bisher konnte die Frage nach der optimalen Therapie für Hochrisikopatientinnen nicht beantwortet werden [Nieto et al., 2000a]. Die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen erschweren dieses Problem zusätzlich. Durch eine gezielte molekulare Analyse mit effektiven, einheitlichen Methoden könnte schließlich betroffenen Patientinnen eine psychisch und physisch belastende Therapie erspart und zudem zu ein erheblicher ökonomischer Gewinn erzielt werden. Es bleibt die Hoffnung, dass in Zukunft durch objektiv messbare molekulare Kriterien für die Ansprechrates bzw. die Wahl des richtigen Therapieansatzes die Perspektive krebskranker Patienten entscheidend verbessert werden kann.

6 Zusammenfassung

Bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom wird nun seit mehreren Jahren im Rahmen von Studienprotokollen (Phase-II und -III) eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation durchgeführt. Diese wird sowohl im Rahmen einer adjuvanten Chemotherapie bei Patientinnen mit ausgedehnter axillärer Lymphknotenmetastasierung als auch mit kurativer Zielsetzung bei Patientinnen mit Fernmetastasen durchgeführt. Die HDCT stellt dabei in vielen Studien ein vielversprechendes Konzept dar. Als Standardtherapie hat sich die HDCT aufgrund der nicht eindeutigen Studienlage jedoch nicht etablieren können.

Eine gezielte molekulare Analyse zur Identifizierung von geeigneten Genen mit effektiven einheitlichen Methoden könnte helfen, Patientinnen zu selektieren, die grundsätzlich eher von einer Chemotherapie profitieren, ggf. speziell von einer HDCT. Die chemoresistente Gruppe könnte einer alternativen Therapiemodalität zugeführt werden, die sich möglicherweise aus den molekularen Grundlagen des Mammakarzinoms ableiten ließe.

Sämtliche Patientinnen waren Teil einer zwischen Juni 1995 bis Juni 2002 durchgeführten, prospektiven Phase-III-Studie, in der eine Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Blutstammzelltransplantation versus dosisintensiviertem Standard getestet wurde (WSG-AM-01-Studie). Die Indikationsstellung zur HDCT erfolgte im Rahmen einer adjuvanten Chemotherapie bei Patientinnen mit ausgedehnter Lymphknotenmetastasierung (Level III) sowie bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom. Insgesamt wurde in dieser Arbeit die Tumor-DNA von 236 metastasierten Mammakarzinomen auf genetische Veränderungen untersucht.

Ziel der Arbeit war die Evaluation objektiv messbarer, molekularer Veränderungen als Prognosefaktoren für das Ansprechen auf HDCT bzw. die Identifizierung spezieller, chemoresistenter Gruppen:

- Mikrosatellitenanalyse (MSI, CIN) nach Mikrodissektion
- p53-Mutationsanalyse (Exons 5-9)
- Immunhistochemische Färbung: KPNA2 (weitere Marker standen aus Untersuchungen der Universität Düsseldorf zur Verfügung).

Die Mikrodissektion wurde nach Erfahrungswerten aus der Arbeit von Dr. med. Peter Wild durchgeführt. Seine Methode ermöglichte es, eine direkte Beziehung zwischen dem histologischem Phänotyp und dem Genotyp herzustellen, da für eine exakte genetische Analyse nur die relevanten Zellverbände unter mikroskopischer Kontrolle isoliert und bildlich

dokumentiert werden konnten.

Bei 191 ausgewählten Patientinnen konnten 156 Tumoren verwendet werden. Bezogen auf die Anzahl interpretierbarer Loci in Primärtumoren (n=156) zeigten 11 Loci eine sichere MSI (7,1%) und 32 Loci einen LOH (20,5%). Die Proben mit häufigen chromosomalen Deletionen wurden als Tumoren mit instabilem chromosomalen Genotyp klassifiziert (CIN-positiv). Für eine große Anzahl von Tumoren war es nicht möglich, ein interpretierbares Ergebnis zu erzielen (61,2%). Ursache dafür waren entweder das Ausbleiben der Amplifikation oder unspezifische Bandenmuster. Die gesamte Ausfallrate aller getesteten Loci betrug 61% (477/780). Die Ausfallraten waren also sehr hoch und die Ergebnisse korrelierten jeweils nur in 18 % der MSI-positiven Tumoren und in etwa 28% der LOH-positiven Tumoren mit den Ergebnissen aus der p53-Analyse. Eine signifikante Aussage konnte in beiden Fällen nicht getroffen werden.

Bei der Sequenzierung des p53-Gens (Exon 5-9) wurden missense-Mutationen entdeckt – Punktmutationen, die eine andere Aminosäure kodierten als der Wildtyp – und sog. stumme Mutationen, deren Codon für dieselbe Aminosäure wie die der zugehörigen Wildtyp-Sequenz stand, somit nicht zu funktionell wirksamen Veränderungen führten. Von insgesamt 236 Tumoren konnten wir für 56 eine missense-Mutation nachweisen. Da bei 68 Tumoren keine Auswertung möglich war, ergibt dies 33,3% (56/168). Daneben fanden wir 37 stumme Mutationen. Bei einem Ausfall von 91/236 Proben ergeben sich 25,5% (37/145). Die Validierung der p53-Sequenzierung erwies sich als problematisch, da sich in einigen Fällen die Mutationen nicht bestätigen ließen. Letztlich konnte nur in 10,7% (18/168) eine missense-Mutation und in 13,1% (19/145) eine stumme Mutation validiert werden. Da die entsprechende p53-Immunhistochemie bei den betroffenen Tumoren jedoch häufig positiv war, bezogen wir diese nicht validierten Mutationen in eine zweite Berechnung mit ein. Dabei ergab sich ein enger Zusammenhang ($p = 0,001$) zwischen der p53-Mutations-Analyse und der Expression in der p53-Immunhistochemie.

Die p53-Mutationen waren zudem assoziiert mit Positivität für Her-2/neu ($p = 0,071$) sowie erhöhter Proliferation ($p = 0,010$). Bezieht man die nicht validierten Mutationen mit ein, ergibt sich eine signifikante Korrelation mit erhöhtem histologischen Grad ($p < 0,001$), ER+ ($p = 0,05$), Her-2/neu+ Tumoren ($p < 0,001$) und erhöhtem Proliferationsindex ($p = 0,005$).

Leider konnte für die Patientinnen mit und ohne p53-Mutation kein signifikanter Unterschied im ereignisfreien ($p = 0,77$) und im Gesamtüberleben ($p = 0,49$) herausgestellt werden.

Karyopherin $\alpha 2$ (KPNA2) stellte sich als ein wichtiger Faktor bezüglich Tumorentstehung und Fortschreiten des Mammakarzinoms dar. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung der

KPNA2-Expression auf die Prognose von Hochrisiko-Brustkrebs-Patientinnen und das Therapieansprechen in der randomisierten WSG-AM-01- Studie zu untersuchen. Die KPNA2-Expression im Zellkern (in >10% vs. <10% der Zellkerne) wurde immunhistochemisch bei 191 Patientinnen untersucht und mit dem klinischen Outcome korreliert (mittlere Nachbeobachtungszeit: 63,3 Monate). Verwendet wurde die Kaplan-Meier- sowie die multivariate Cox-Analyse. KPNA2-Überexpression (n=74, 39%) korrelierte in der univariaten Analyse signifikant mit einem kürzeren ereignisfreien sowie Gesamtüberleben in beiden Therapiegruppen. Die multivariate Analyse zeigte die Überexpression von KPNA2 als unabhängigen Prognosefaktor für ein vermindertes Gesamtüberleben (HR=1,86 [95% KI: 1,07-3,23, p=0,03]). Dieser prädiktive Wert war unabhängig von den basal-like/Her-2/neu-Subtypen signifikant assoziiert mit KPNA2 und zeigte sich vor allem bei den G2-Tumoren. Unsere Daten lassen vermuten, dass die KPNA2-Expression im Zellkern als neuer prognostischer Faktor bei LK-positiven Patientinnen geeignet ist, besonders bei den G2-Tumoren zur Identifizierung zweier Untergruppen unterschiedlicher Prognose. Die KPNA2-Expression kann auch als Marker für eine globale Chemoresistenz betrachtet werden, welche nicht durch konventionelle Dosisveränderungen der Chemotherapie beim fortgeschrittenen Mammakarzinom beherrscht werden kann. Insgesamt halten wir die KPNA2-Expression für einen vielversprechenden prädiktiven und prognostischen Faktor beim Mammakarzinom, dessen Bedeutung in weiteren Studien zu erörtern ist.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- Aaltonen LA**, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al.: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993 May 7;260(5109):812-6.
- Aaltonen LA**, Peltomäki P, Mecklin JP, Järvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M: Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1994; 54:1645-1648.
- Aaltonen LA**, Aslovaara MD, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomäki P, Chadwick RB, Kaariainen H, Eskelinen MD, Järvinen H, Mecklin JP, Chapelle A: Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998;338:1481-1487.
- Aas T**, Børresen AL, Geisler S, Smith-Sørensen B, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA, Lønning PE: Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med*. 1996 Jul;2(7):811-4.
- Adem C**, Soderberg CL, Cunningham JM, Reynolds C, Sebo TJ, Thiobodeau SN, Hartmann LC, Jenkins RB: Microsatellite instability in hereditary and sporadic breast cancer. *Int J Cancer* 2003;107:580-582.
- Aldaz CM**, Chen T, Sahin A, Cunningham J, Bondy M: Comparative allelotyping of in situ and invasive human breast cancer: High frequency of microsatellite instability in lobular breast carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55:3976-3981.
- Allgäuer M**, Andreesen R, Bazanella-Hofstädter A, Bross K, Dengler R, Fembacher P, Hofstädter F, Herbst M, Kreuser ED, Seelbach-Göbel B, Scharl A, Stuth R: Therapie des metastasierten Mamma-Karzinoms. Tumorzentrum Regensburg, Empfehlungen der Projektgruppen, Mammakarzinom 2001; 130-142.
- Anbazhagan R**, Fujii H, Gabrielson E: Microsatellite instability is uncommon in breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5:839-844.
- Andersson J**, Larsson L, Kloor S, Holmberg L, Nilsson J, Inganäs M, Carlsson G, Ohl J, Rudenstam CM, Gustavsson B, Bergh J: Worse survival for TP53 (p53)-mutated breast cancer patients receiving adjuvant CMF. *Ann Oncol*. 2005 May;16(5):743-8.
- Ando Y**, Iwase H, Ichihara S, Toyoshima S, Nakamura T, Yamashita H, Toyama T, Omoto Y, Karamatsu S, Mitsuyama S, Fujii Y, Kobayashi S: Loss of heterozygosity and microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Lett* 2000; 156:207-214.
- Anonymous**: Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998a; 352:930-942.
- Anonymous**: Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998b; 351:1451-1467.
- Azim H**, Azim HA Jr: Targeting Her-2/neu in Breast Cancer: As Easy as This! *Oncology*. 2008 Aug 18;74(3-4):150-157.
- Barbareschi M**, Prognostic value of the immunohistochemical expression of p53 in breast carcinomas: a review of the literature involving over 9000 patients. *Applied Immunohistochemistry* 1996;4:106-116.
- Bässler R**: Mamma. Remmele W (Hrsg.): Pathologie Bd. 4. 2te, neubearb. Aufl. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1992.
- Bast RC Jr**, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H Jr, Jessup JM, Kemeny N, Locker GY, Mennel RG, Somerfield MR: American Society of Clinical Oncology Tumor Markers Expert Panel: 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2001 Mar 15;19(6):1865-78.
- Baumann CK**, Castiglione-Gertsch M: Trastuzumab. *Schweiz Med Forum* 2007;7:879-883.
- Bearman SI**, Overmoyer BA, Bolwell BJ, Taylor CW, Shpall EJ, Cagnoni PJ, Mechling BE, Ronk B, Baron AE, Pudry MH, Ross M, Jones RB: High-dose chemotherapy with autologous peripheral blood progenitor cell support for primary breast cancer in patients with 4-9 involved axillary lymph nodes. *Bone Marrow Transplant* 1997;20:931-937.
- Beckmann MW**, Picard F, An HX, van Roeyen CR, Dominik SI, Mosny DS, Schnurch HG, Bender HG, Niederacher D: Clinical impact of detection of loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 markers in sporadic breast cancer. *Br J Cancer* 1996; 73:1220-1226.
- Benachou N**, Guiral S, Gorska-Flipot I, Labuda D, Sinnott D: Frequent loss of heterozygosity at the DNA mismatch-repair loci hMLH1 and hMSH3 in sporadic breast cancer. *Br J Cancer* 1999; 79:1012-1017.
- Ben Yehuda A**, Globerson A, Krichevsky S, Bar On H, Kidron M, Friedlander Y, Friedman G, Ben Yehuda D: Ageing and the mismatch repair system. *Mech Ageing Dev*. 2000 Dec 20;121(1-3):173-9.
- Bergh J**, Norberg T, Sjogren S, Holmberg L: Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med* 1995; 1:1029-1034.
- Berns EM**, Foekens JA, Vossen R, Look MP, DeVilee P, Henzen-Logmans SC, van Staveren IL, van Putten WL, Inganäs M, Meijer-van Gelder ME, Cornelisse C, Claassen CJ, Portengen H, Bakker B, Klijn JG: Complete sequencing of TP53 predicts poor response to systemic therapy of advanced breast cancer. *Cancer Res*. 2000 Apr 15;60(8):2155-62.
- Bertheau P**, Turpin E, Rickman DS, Espié M, de Reyniès A, Feugeas JP, Plassa LF, Soliman H, Varna M, de Roquancourt A, Lehmann-Che J, Beuzard Y, Marty M, Misset JL, Janin A, de Thé H: Exquisite sensitivity of TP53 mutant and basal breast cancers to a dose-dense epirubicin-cyclophosphamide regimen. *PLoS Med*. 2007 Mar;4(3):e90.

- Bezwod WR**, Seymour L, Dansey RD: High-dose chemotherapy with hematopoietic rescue as primary treatment for metastatic breast cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1995; 13:2483-2489.
- Bezwod WR**: Randomized, controlled trial of high dose chemotherapy (HD-CNVp) versus standard dose (CAF) chemotherapy for high risk, surgically treated, primary breast cancer. *Proc ASCO* 1999; 18:2a (#4).
- Bischoff FR**, Ponstingl H: Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* 1991;354:80-82.
- BLOOM HJ, RICHARDSON WW**: Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957 Sep;11(3):359-77.
- Boland CR**, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:5248-5257.
- Børresen-Dale AL**: TP53 and breast cancer. *Hum Mutat*. 2003 Mar;21(3):292-300.
- Børresen AL**, Andersen TI, Eyfjörd JE, Cornelis RS, Thorlacius S, Borg A, Johansson U, Theillet C, Scherneck S, Hartman S, et al.: TP53 mutations and breast cancer prognosis: particularly poor survival rates for cases with mutations in the zinc-binding domains. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995 Sep;14(1):71-5.
- Broun ER**, Nichols CR, Kneebone P, Williams SD, Loehrer PJ, Einhorn LH, Tricot GJ: Long-term outcome of patients with relapsed and refractory germ cell tumors treated with high-dose chemotherapy and autologous bone marrow rescue. *Ann Intern Med* 1992; 117:124-128.
- Bull SB**, Ozcelik H, Pinnaduwa D, Blackstein ME, Sutherland DA, Pritchard KI, Tzontcheva AT, Sidlofsky S, Hanna WM, Qizilbash AH, Tweeddale ME, Fine S, McCready DR, Andrulis IL: The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer. *J Clin Invest*. 2004 Jan 1;22(1):86-96.
- Bunz F**, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Williams J, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest*. 1999 Aug;104(3):263-9.
- Bykov VJ**, Issaeva N, Zache N, Shilov A, Hultcrantz M, Bergman J, Selivanova G, Wiman KG: Reactivation of mutant p53 and induction of apoptosis in human tumor cells by maleimide analogs. *J Biol Chem*. 2005 Aug 26;280(34):30384-91.
- Cahill DP**, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B: Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998; 392:300-303.
- Cai KQ**, Albarracín C, Rosen D, Zhong R, Zheng W, Luthra R, Broaddus R, Liu J: Microsatellite instability and alteration of the expression of hMLH1 and hMSH2 in ovarian clear cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2004 May;35(5):552-9.
- Caldés T**, Perez-Segura P, Tosar A, de La Hoya M, Diaz-Rubio E: Microsatellite instability correlates with negative expression of estrogen and progesterone receptors in sporadic breast cancer. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2000;20(5):283-91.
- Carney JP**, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR3rd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH: The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell*. 1998 May 1;93(3):477-86.
- Carter P**, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM: Humanisation of an anti p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4285-4289.
- Chagpar A**, Magliocco A, Kerviche A, Tan L, Walley B, DeCoteau JF: The replication error phenotype is associated with the development of distant metastases in hormonally treated patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2004 Mar 1;100(5):913-9.
- Chappell SA**, Walsh T, Walker RA, Shaw JA: Loss of heterozygosity at chromosome 6q in preinvasive and early invasive breast carcinomas. *Br J Cancer* 1997; 75:1324-1329.
- Chaves P**, Cruz C, Lage P, Claro I, Cravo M, Leitão CN, Soares J: Immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins as a useful tool for the identification of colorectal carcinoma with the mutator phenotype. *J Pathol*. 2000 Aug;191(4):355-60.
- Chen YC**, Su YN, Chou PC, Chiang WC, Chang MC, Wang LS, Teng SC, Wu KJ: Overexpression of NBS1 contributes to transformation through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Biol Chem* 2005;280(37):32505-32511.
- Chiang YC**, Teng SC, Su YN, Hsieh FJ, Wu KJ, c-Myc directly regulates the transcription of the NBS1 gene involved in DNA double-strand break repair. *J Biol Chem*. 2003 May 23;278(21):19286-91.
- Chook YM**, Blobel G: Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol* 2001;11:703-715.
- Chook YM**, Blobel G: Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. *Nature*. 1999 May 20;399(6733):230-7.
- Clark GM**, Sledge GW Jr, Osborne CK, McGuire WL: Survival from first recurrence: Relative importance of prognostic factors in 1,015 breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1987;5:55-61.
- Cobleigh MA**, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al.: Multinational study of the efficacy and safety of humanised anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2 overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17:2639-2648.
- Contegiacomo A**, Palmirotta R, De Marchis L, Pizzi C, Mastranzo P, Delrio P, Petrella G, Figliolini M, Bianco AR, Frati L: Microsatellite instability and pathological aspects of breast cancer. *Int J Cancer* 1995; 64:264-268.
- Coombes RC**, Howell A, Emson M, Peckitt C, Gallagher C, Bengala C, Tres A, Welch R, Lawton P, Rubens R, Woods E, Haviland J, Vigushin D, Kanfer E, Bliss JM: High dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation as adjuvant therapy for primary breast cancer patients with four or more lymph nodes involved: long-term results of an international randomised trial. *Ann Oncol*. 2005 May;16(5):726-34.

- Crump M**, Gluck S, Tu D, Stewart D, Levine M, Kirkbride P, Dancy J, O'Reilly S, Shore T, Couban S, Girouard C, Marlin S, Shepherd L, Pritchard KI: Randomized trial of high-dose chemotherapy with autologous peripheral-blood stem-cell support compared with standard-dose chemotherapy in women with metastatic breast cancer: NCIC MA.16. *J Clin Oncol*. 2008 Jan 1;26(1):37-43.
- Dahl E**, Kristiansen G, Gottlob K, Klamann I, Ebner E, Hinemann B, Hermann K, Pilarsky C, Dürst M, Klinkhammer-Schalke M, Blaszyk H, Knuechel R, Hartmann A, Rosenthal A, Wild PJ: Molecular profiling of laser-microdissected matched tumor and normal breast tissue identifies karyopherin $\alpha 2$ as a potential novel prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(13):3950-3960
- Dankof A**, Fritzsche FR, Dahl E, Pahl S, Wild PJ, Dietel M, Hartmann A, Kristiansen G: KPNA2 protein expression in invasive breast carcinoma and matched peritumoral ductal carcinoma in situ. *Virchows Arch* (2007) 451:877-881
- De Marchis L**, Contegiacomo A, D'Amico C, Palmirotta R, Pizzi C, Ottini L, Mastranzo P, Figliolini M, Petrella G, Amanti C, Battista P, Bianco AR, Frati L, Cama A, Mariani-Costantini R: Microsatellite instability is correlated with lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3:241-248.
- Demokan S**, Muslumanoglu M, Yazici H, Igci A, Dalay N: Investigation of microsatellite instability in Turkish breast cancer patients. *Pathol Oncol Res*. 2002;8(2):138-41.
- de Roos MA**, de Bock GH, de Vries J, van der Vegt B, Wesseling J: p53 overexpression is a predictor of local recurrence after treatment for both in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Surg Res*. 2007 Jun 1;140(1):109-14.
- Devilee P**, van den Broek M, Kuipers-Dijkshoorn N, Kolluri R, Khan PM, Pearson PL, Cornelisse CJ: At least four different chromosomal regions are involved in loss of heterozygosity in human breast carcinoma. *Genomics* 1989;5:554-560.
- Diallo-Danebrock R**, Ting E, Gluz O, Herr A, Mohrmann S, Geddert H, Rody A, Schaefer KL, Baldus SE, Hartmann A, Wild PJ, Burson M, Gabbert HE, Nitz U, Poremba C: Protein expression profiling in high-risk breast cancer patients treated with high-dose or conventional dose-dense chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2007 Jan 15;13(2 Pt 1):488-97.
- Diaz-Cano SJ**: Are PCR artifacts in microdissected samples preventable? *Hum Pathol* 2001; 32:1415-1416.
- Dietmaier W**, Hartmann A, Wallinger S, Heinmöller E, Kerner T, Endl E, Jauch KW, Hofstädter F, Rüschhoff J: Multiple Mutation Analysis in Single Tumor Cells with Improved Whole Genome Amplification. *Am J Pathol* 1999;154:83-95.
- Dillon EK**, de Boer WB, Papadimitriou JM, Turbett GR: Microsatellite instability and loss of heterozygosity in mammary carcinoma and its probable precursors. *Br J Cancer* 1997; 76:156-162.
- Duffy MJ**: Cellular oncogenes and suppressor genes as prognostic markers in cancer. *Clin Biochem*. 1993 Dec;26(6):439-47.
- Duffy MJ**: Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem* 2005;51(3):494-503.
- Eberlein TJ**, Recht A, Schnitt SJ, Hayes, DF (Hrsg.): *Brustkrebs. Ein Farbatlas*. Urban & Fischer, München, 1995.
- Eifel P**, Axelson JA, Costa J, Crowley J, Curran WJ, Deshler A, Fulton S, Hendricks CB, Kemeny M, Kornblith AB, Louis TA, Markman M, Mayer R, Roter D: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:979-989.
- Elledge RM**, Allred DC: Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;52(1-3):79-98.
- Ellsworth RE**, Ellsworth DL, Deyarmin B, Hoffman LR, Love B, Hooke JA, Shriver CD: Timing of critical genetic changes in human breast disease. *Ann Surg Oncol*. 2005 Dec;12(12):1054-60.
- Elston CW**, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19:403-410.
- Feki A**, Irminger-Finger I: Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004 Nov;52(2):103-16.
- Ferretti G**, Felici A, Papaldo P, Fabi A, Cognetti F: HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2007 Feb;19(1):56-62.
- Finlay CA**, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ: Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 1988; 8:531-539.
- Fishel R**, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R: The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-1038.
- Fisher ER**, Gregorio RM, Fisher B, Redmond C, Vellios F, Sommers SC: The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from findings of the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no. 4). *Cancer*. 1975 Jul;36(1):1-85.
- Fisher ER**, Sass R, Fisher B: Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Project for Breast Cancers (protocol no. 4). X. Discriminants for tenth year treatment failure. *Cancer* 1984; 53:712-723.
- Ford D**, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struwing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BA, Gayther SA, Zelada-Hedman M, et al.: Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*. 1998 Mar;62(3):676-89.
- Formantici C**, Orlandi R, Ronchini C, Pilotti S, Ranzani GN, Colnaghi MI, Menard S: Absence of microsatellite instability in breast carcinomas with both p53 and c-erbB-2 alterations. *J Pathol* 1999; 187:424-427.
- Frei E**, Antman K, Teicher B, Eder P, Schnipper L: Bone marrow autotransplantation for solid tumors--prospects. *J Clin Oncol* 1989; 7:515-526.
- Frei E**, Teicher BA, Holden SA, Cathcart KN, Wang YY: Preclinical studies and clinical correlation of the effect of alkylating dose. *Cancer Res* 1988; 48:6417-6423.
- Foulkes WD**: BRCA1 and BRCA2: chemosensitivity, treatment outcomes and prognosis. *Familial Cancer* 2006;5:135-142.

- Foulkes WD**, Grainge MJ, Rakha EA, Green AR, Ellis IO: Tumor size is an unreliable predictor of prognosis in basal-like breast cancers and does not correlate closely with lymph node status. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Jul 4.
- Futreal P**, Soderkvist J, Mark J, Lelehart C, Coham J, Barret C, Iseman .: Detection of frequent allelic loss on proximal chromosome 17q in sporadic breast carcinoma using microsatellite length polymorphisms. *Cancer Res* 1992;52:2624-2627.
- Galea MH**, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO: The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 22:207-219.
- Gary RK**, Jensen DA: The p53 inhibitor pifithrin- α forms a sparingly soluble derivative via intramolecular cyclization under physiological conditions. *Mol Pharm*. 2005 Nov-Dec;2(6):462-74.
- Gasco M**, Shami S, Crook T: The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2002;4(2):70-6.
- Geisler JP**, Goodheart MJ, Sood AK, Holmes RJ, Hatterman-Zogg MA, Buller RE: Mismatch repair gene expression defects contribute to microsatellite instability in ovarian carcinoma. *Cancer*. 2003 Nov 15;98(10):2199-206.
- Geisler S**, Lønning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, Lillehaug JR, Akslen LA, Børresen-Dale AL: Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res*. 2001 Mar 15;61(6):2505-12.
- Gianni AM**, Siena S, Bregni M, Di Nicola M, Orefice S, Cusumano F, Salvadori B, Luini A, Greco M, Zucali R, Rilke F, Zambetti M, Valagussa P, Bonadonna G: Efficacy, toxicity, and applicability of high-dose sequential chemotherapy as adjuvant treatment in operable breast cancer with 10 or more involved axillary nodes: five-year results. *J Clin Oncol* 1997; 15:2312-2321.
- Gluz O**, Nitz UA, Harbeck N, Ting E, Kates R, Herr A, Lindemann W, Jackisch C, Berdel WE, Kirchner H, Metzner B, Werner F, Schütt G, Frick M, Poremba C, Diallo-Danebrock R, Mohrmann S; West German Study Group: Triple-negative high-risk breast cancer derives particular benefit from dose intensification of adjuvant chemotherapy: results of WSG AM-01 trial. *Ann Oncol*. 2008 May;19(5):861-70.
- Goldhirsch A**, Glick JH, Gelber RD, Senn HJ: Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1601-1608.
- Gorlich D**, Pante N, Kutay U, Aebi U, Bischoff FR: Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J* 1996b;15:5584-5594.
- Greenberg PA**, Hortobagyi GN, Smith TL, Ziegler LD, Frye DK, Buzdar AU: Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996;14:2197-2205.
- Greer CE**, Lund JK, Manos MM: PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods Appl* 1991; 1:46-50.
- Guarneri V**, Bengala C, Orlandini C, Gennari A, Donati S, Campani D, Collecchi P, Maur M, Conte PF, HER2 overexpression as a prognostic factor in metastatic breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy and autologous stem cell support. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Sep;34(5):413-7.
- Gudkov A**, Komarova E: Isolation of p53 inhibitors by screening chemical libraries in cell-based readout system. *Methods Mol Biol*. 2003;223:635-48.
- Gudkov AV**, Komarova EA: Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jun 10;331(3):726-36.
- Gulati S**, Lemoli R, Fraig M: Newer approaches in treating chronic myelogenous leukemia. *Stem Cells* 1993; 11 Suppl 3:14-19.
- Halling KC**, Harper J, Moskaluk CA, Thibodeau SN, Petroni GR, Yustein AS, Tosi P, Minacci C, Roviello F, Piva P, Hamilton SR, Jackson CE, Powell SM: Origin of microsatellite instability in gastric cancer. *Am J Pathol*. 1999 Jul;155(1):205-11.
- Halling KC**, Roche PC: Immunohistochemical analysis for hMLH1 and hMLH2 expression in colorectal cancer. *Colorectal cancer methods and protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, Inc 2001.81-86.
- Hamelin R**, Chalastanis A, Colas C, El Bchiri J, Mercier D, Schreurs AS, Simon V, Svrcek M, Zaanen A, Borie C, Buhard O, Capel E, Zouali H, Praz F, Muleris M, Fléjou JF, Duval A: Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers. *Bull Cancer*. 2008 Jan 1;95(1):121-32.
- Hanrahan EO**, Broglio K, Frye D, Buzdar AU, Theriault RL, Valero V, Booser DJ, Singletary SE, Strom EA, Gajewski JL, Champlin RE, Hortobagyi GN: Randomized trial of high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell support for high-risk primary breast carcinoma: follow-up at 12 years. *Cancer*. 2006 Jun 1;106(11):2327-36.
- Haraldsson K**, Loman N, Zhang QX, Johannsson O, Olsson H, Borg A: BRCA2 germ-line mutations are frequent in male breast cancer patients without a family history of the disease. *Cancer Res*. 1998 Apr 1;58(7):1367-71.
- Hartmann A**, Blaszyk H, McGovern RM, Schroeder JJ, Cunningham J, De-Vries EM, Kovach JS, Sommer SS: P53 gene mutations inside and outside of exons 5-8: the patterns differ in breast and other cancers. *Oncogene* 1995;10(4):681-688.
- Hartmann A**, Blaszyk H, Kovach JS, Sommers SS: The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer. *Trends Genet* 1997; 13:27-33.
- Hartmann A**, Wild P, Reichle A, Hofstädter F: Microsatellite instability is an independent indicator of poor prognosis in patients with advanced breast cancer treated by high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *Proc AACR* 2001;42:858.
- Hartmann LC**, Ingle JN, Wold LE, Farr GH Jr, Grill JP, Su JQ, Mailhe NJ, Krook JE, Witzig TE, Roche PC: Prognostic value of c-erbB2 overexpression in axillary lymph node positive breast cancer. Results from a randomized adjuvant treatment protocol. *Cancer*. 1994 Dec 1;74(11):2956-63.

- Hatch SB**, Lightfoot HM Jr, Garwacki CP, Moore DT, Calvo BF, Woosley JT, Sciarrotta J, Funkhouser WK, Farber RA: Microsatellite instability testing in colorectal carcinoma: choice of markers affects sensitivity of detection of mismatch repair-deficient tumors. *Clin Cancer Res*. 2005 Mar 15;11(6):2180-7.
- Hayes DF**, Do we need prognostic factors in nodal-negative breast cancer? Arbitr. *Eur J Cancer*. 2000 Feb;36(3):302-6.
- Heikkinen K**, Rapakko K, Karppinen SM, Erkkö H, Knuutila S, Lundán T, Mannermaa A, Børresen-Dale AL, Borg A, Barkardottir RB, Petrini J, Winqvist R, RAD50 and NBS1 are breast cancer susceptibility genes associated with genomic instability. *Carcinogenesis*. 2006 Aug;27(8):1593-9.
- Hensel M**, Schneeweiss A, Sinn HP, Egerer G, Solomayer E, Haas R, Bastert G, Ho AD: P53 is the strongest predictor of survival in high-risk primary breast cancer patients undergoing high-dose chemotherapy with autologous blood stem cell support. *Int J Cancer* 2002; 100:290-296.
- Hieken TJ**, Cheregi J, Farolan M, Kim J, Velasco JM: Predicting relapse in ductal carcinoma in situ patients: an analysis of biologic markers with long-term follow-up. *Am J Surg*. 2007 Oct;194(4):504-6.
- Hoogstratten B**, George S, Samal B: Combination chemotherapy and adriamycin in patients with advanced breast cancer. *Cancer* 1976;38:13-20.
- Hosking L**, Trowsdale J, Nicolai H, Solomon E, Foulkes W, Stamp G, Signer E, Jeffreys A: A somatic BRCA1 mutation in an ovarian tumour. *Nat Genet* 1995; 9:343-344.
- Hsu HM**, Wang HC, Chen ST, Hsu GC, Shen CY, Yu JC, Breast cancer risk is associated with the genes encoding the DNA double-strand break repair Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Oct;16(10):2024-32.
- Huiping C**, Johannsdottir JT, Arason A, Olafsdottir GH, Eiríksdóttir G, Egilsson V, Ingvarsson S: Replication error in human breast cancer: comparison with clinical variables and family history of cancer. *Oncol Rep* 1999; 6:117-122.
- Ionov Y**, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363:558-561.
- Iwase H**, Greenman JM, Bames DM, Bobrow L, Hodgson S, Mathew CG: Loss of heterozygosity in the oestrogen receptor gene in breast cancer. *Br J Cancer* 1995;71:448-450.
- Jass JR**, Cottier DS, Jeevaratnam P, Pokos V, Holdaway KM, Bowden ML, Van de Water NS, Browett PJ: Diagnostic use of microsatellite instability in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Lancet* 1995;346:1200-1201.
- Jass JR**, Do KA, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP, Searle J, Radford-Smith G, Young J, Leggett B: Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* 1998; 42:673-679.
- Jatoi I**, Hilsenbeck SG, Clark GM, Osborne CK: Significance of axillary lymph node metastasis in primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999 Aug;17(8):2334-40.
- Jóhannsson OT**, Ranstam J, Borg A, Olsson H: Survival of BRCA1 breast and ovarian cancer patients: a population-based study from southern Sweden. *J Clin Oncol*. 1998 Feb;16(2):397-404.
- Kai K**, Nishimura R, Arima N, Miyayama H, Iwase H: p53 expression status is a significant molecular marker in predicting the time to endocrine therapy failure in recurrent breast cancer: a cohort study. *Int J Clin Oncol*. 2006 Dec;11(6):426-33.
- Kallioniemi OP**, Wagner U, Kononen J, Sauter G: Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10:657-662.
- Kandioler-Eckersberger D**, Ludwig C, Rudas M, Kappel S, Janschek E, Wenzel C, Schlagbauer-Wadl H, Mittlböck M, Gnant M, Steger G, Jakesz R: TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2000 Jan;6(1):50-6.
- Karnik P**, Plummer S, Casey G, Myles J, Tubbs R, Crowe J, Williams BR: Microsatellite instability at a single locus (D11S988) on chromosome 11p15.5 as a late event in mammary tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 1995; 4:1889-1894.
- Kato S**, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C, Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8424-9.
- Keohavong P**, Thilly WG: Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(23) 9253-9257.
- Khilko N**, Bourne P, Qi Yang, Ping Tang: Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 may not play an essential role in breast carcinogenesis. *Int J Surg Pathol*. 2007 Jul;15(3):233-41.
- Kim YS**, Konoplev SN, Montemurro F, Hoy E, Smith TL, Rondon G, Champlin RE, Sahin AA, Ueno NT: HER-2/neu overexpression as a poor prognostic factor for patients with metastatic breast cancer undergoing high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation. *Clin Cancer Res* 2001; 7:4008-4012.
- Kim GP**, Colangelo LH, Wieand HS, Paik S, Kirsch IR, Wolmark N, Allegra CJ; National Cancer Institute: Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J Clin Oncol*. 2007 Mar 1;25(7):767-72.
- Knudson AG**: Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 1985;45(4):1437-1443.
- Kröger N**, Frick M, Gluz O, Mohrmann S, Metzner B, Jackisch C, Ko Y, Lindemann HW, Meier CR, Lohrmann HP, Ruffert U, Hänel M, Bodenstern H, Neubauer A, Ehninger G, Wolf HH, Kolbe K, Burock K, Zander AR, Nitz U: Randomized trial of single compared with tandem high-dose chemotherapy followed by autologous stem-cell transplantation in patients with chemotherapy-sensitive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Aug 20;24(24):3919-26.
- Kröger N**, Milde-Langosch K, Riethdorf S, Schmoor C, Schumacher M, Zander AR, Lönning T: Prognostic and predictive effects of immunohistochemical factors in high-risk primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2006 Jan 1;12(1):159-68.

- Kuligina ES**, Grigoriev MY, Suspitsin EN, Buslov KG, Zaitseva OA, Yatsuk OS, Lazareva YR, Togo AV, Imyanitov EN: Microsatellite instability analysis of bilateral breast tumors suggests treatment-related origin of some contralateral malignancies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007 Jan;133(1):57-64.
- Lacroix M**, Toillon RA, Leclercq G: p53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Jun;13(2):293-325.
- Lai H**, Ma F, Trapido E, Meng L, Lai S: Spectrum of p53 tumor suppressor gene mutations and breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat*. 2004 Jan;83(1):57-66.
- Lakhani SR**, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PP, McGuffog L, Easton DF: The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol*. 2002 May 1;20(9):2310-8.
- Langerød A**, Zhao H, Borgan Ø, Nesland JM, Bukholm IR, Ikdaahl T, Kåresen R, Børresen-Dale AL, Jeffrey SS: TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2007;9(3):R30.
- Lane DP**: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358(6381):15-16.
- Lee SC**, Berg KD, Sherman ME, Griffin CA, Eshleman JR: Microsatellite instability is infrequent in medullary breast cancer. *Am J Clin Pathol* 2001; 115:823-827.
- Lengauer C**, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396:643-649.
- Lichtman SM**, Budman D, Bosworth S, Allen S, Schulman P, Weiselberg L, Weiss R, Lehrman D, Vinciguerra V: Adjuvant therapy of stage II breast cancer treated with CMFVP, radiation therapy and VATH following lumpectomy. *Am J Clin Oncol* 1991;14:317-321.
- Lindor NM**, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, Walsh-Vockley C, Petersen GM, Walsh MD, Leggett BA, Young JP, Barker MA, Jass JR, Hopper J, Gallinger S, Bapat B, Redston M, Thibodeau SN: Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol*. 2002 Feb 15;20(4):1043-8.
- Link BK**, Budd GT, Scott S, Dickman E, Paul D, Lawless G, Lee MW, Fridman M, Ford J, Carter WB; Oncology Practice Pattern Study Working Group: Delivering adjuvant chemotherapy to women with early-stage breast carcinoma: current patterns of care. *Cancer*. 2001 Sep 15;92(6):1354-67.
- Liotta L, Petricoin E**: Molecular profiling of human cancer. *Nat Rev Genet* 2000; 1:48-56.
- Liu B**, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, Papadopolous N, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR: Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet* 1995; 9:48-55.
- Lønning PE**, Børresen-Dale AL: Interaction between p53 staining and high-dose chemotherapy in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Apr 1;12(7 Pt 1):2289.
- Lothe RA**, Peltomaki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Pylkkanen L, Heimdal K, Andersen TI, Moller P, Rognum TO: Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993; 53:5849-5852.
- Luqmani YA**, Mathew M, Lobo S: Frequent microsatellite alterations in a predominantly younger age of onset breast cancer population. *Int J Mol Med*. 2003 Jan;11(1):117-24.
- Marcus VA**, Madlensky L, Gryfe R, Kim H, So K, Millar A, Temple LK, Hsieh E, Hiruki T, Narod S, Bapat BV, Gallinger S: Immunohistochemistry for hMLH1 and hMLH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 1999;23:1248-1255.
- McGuire WL**: Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines. *J Natl Cancer Inst*; 1991:154-155.
- Mendez O**, Manas S, Peinado, Fabra A, Escobedo A, Moreno A, Sierra A: Microsatellite instability is associated with the loss of apoptosis in ductal breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 65:171-177.
- Meuth M**: The structure of mutations in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1990;1032:1-17.
- Miki Y**, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266:66-71.
- Muller A**, Edmonston TB, Corao DA, Rose DG, Palazzo JP, Becker H, Fry RD, Rüschhoff J, Fishel R: Exclusion of breast cancer as an integral tumor of hereditary colorectal cancer. *Cancer Res* 2002; 62:1014-1019.
- Mullis KB**: The unusual origin of the polymerase reaction. *Sci Am* 1990; 262:56-5.
- Murata H**, Khattar NH, Kang Y, Gu L, Li GM: Genetic and epigenetic modification of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in sporadic breast cancer with microsatellite instability. *Oncogene*. 2002 Aug 22;21(37):5696-703.
- Nieto Y**, Cagnoni PJ, Nawaz S, Shpall EJ, Yerushalmi R, Cook B, Russell P, McDermit J, Murphy J, Bearman SI, Jones RB: Evaluation of the predictive value of Her-2/neu overexpression and p53 mutations in high-risk primary breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2000b; 18:2070-2080.
- Nieto Y**, Champlin RE, Wingard JR, Vredenburgh JF, Elias AD, Richardson P, Glaspy J, Jones RB, Stiff PJ, Bearman SI, Cagnoni PJ, McSweeney PA, LeMaistre CF, Pecora AL, Shpall EF: Status of high-dose chemotherapy for breast cancer: a review. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000a; 6:476-495.
- Nitz U**: Hochdosis-Chemotherapie des Mammakarzinoms, eine Standortbestimmung. *Dt Ärzteblatt* 2000; 97:A245-250.
- Nitz UA**, Mohrmann S, Fischer J, Lindemann W, Berdel WE, Jackisch C, Werner C, Ziske C, Kirchner H, Metzner B, Souchon R, Ruffert U, Schütt G, Pollmanns A, Schmoll HJ, Middecke C, Baltzer J, Schrader I, Wiebringhaus H, Ko Y, Rösel S, Schwenzer T, Wernet P, Hinke A, Bender HG, Frick M; West German Study Group: Comparison of rapidly cycled tandem high-dose chemotherapy

- plus peripheral-blood stem-cell support versus dose-dense conventional chemotherapy for adjuvant treatment of high-risk breast cancer: results of a multicentre phase III trial. *Lancet*. 2005 Dec 3;366(9501):1935-44.
- Nocito A**, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G: Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer* 2001; 94:1-5.
- Olayioye MA**, Neve RM, Lane HA, Hynes NE: The erbB signalling network: heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000;19:3159-3167.
- Olivier M**, Langerød A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, Theillet C, Rodriguez C, Lidereau R, Bièche I, Varley J, Bignon Y, Uhrhammer N, Winqvist R, Jukkola-Vuorinen A, Niederacher D, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Børresen-Dale AL: The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Feb 15;12(4):1157-67.
- Overgaard J**, Yilmaz M, Guldberg P, Hansen LL, Alsner J: TP53 mutation is an independent prognostic marker for poor outcome in both node-negative and node-positive breast cancer. *Acta Oncol*. 2000;39(3):327-33.
- Parsons R**, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B: Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55:5548-5550.
- Paul TT**, Gellert M: Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev*. 1999 May 15;13(10):1276-88.
- Paulson TG**, Wright FA, Parker BA, Russack V, Wahl GM: Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis breast cancer. *Cancer Res* 1996;56:4021-4026.
- Pegram M**, Hsu S, Lewis G, Pietras R, Beryt M, Sliwkowski M, Coombs D, Baly D, Kabbinnar F, Slamon D: Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 1999; 18:2241-2251.
- Pegram MD**, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twaddell T, Glaspy JA, Slamon DJ: Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 1998; 16:2659-2671.
- Peltomäki P**: Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Mar 15;21(6):1174-9.
- Pereira H**, Pinder SE, Sibbering DM, Galea MH, Elston CW, Blamey RW, Robertson JF, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer. IV: Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. *Histopathology* 1995; 27:219-226.
- Perou CM**, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
- Peters WP**, Berry D, Vredenburgh JJ et al.: Five year follow-up of high-dose combination alkylating agents with autologous bone marrow transplantation as consolidation after standard dose cyclophosphamide, doxorubicin and fluorouracil for primary breast cancer involving > 10 axillary lymph nodes (Dukes/CALGB 8782). *Proc ASCO* 1995; 14:317 (#933).
- Peters WP**, Rosner G, Vredenburgh J, Shpall E, Crump M, Richardson P, Marks L, Cirincione C, Wood W, Henderson I, Hurd D, Norton L for CALGB, SWOG and NCIC: A prospective, randomized comparison of two doses of combination alkylating agents (AA) as consolidation after CAF in high-risk primary breast cancer involving ten or more axillary lymph nodes (LN): Preliminary results of CALGB 9082/SWOG 9114/NCIC MA-13. *Proc ASCO* 1999; 18:1a (#2).
- Peters WP**, Ross M, Vredenburgh JJ, Meisenberg B, Marks LB, Winer E, Kurtzberg J, Bast RC Jr, Jones R, Shpall E, et al.: High-dose chemotherapy and autologous bone marrow support as consolidation after standard dose adjuvant therapy for high-risk primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1993;11:1132-1143.
- Peters WP**, Shpall EJ, Jones RB, Olsen GA, Bast RC, Gockerman JP, Moore JO: High-dose combination alkylating agents with bone marrow support as initial treatment for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1988;6:1368-1376.
- Pharoah PD**, Day NE, Caldas C: Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 1999 Aug;80(12):1968-73.
- Pizzi C**, Panico L, De Marchis L, Mastranzo P, Di Maio M, D'Amico C, Limite G, Pettinato G, Cocozza S, Bianco AR, Contegiacomo A: p53 expression is decreased in primary breast carcinomas with microsatellite instability. *Breast Cancer Res Treat*. 2002 Jun;73(3):257-66.
- Powierska-Czarny J**, Miscicka-Sliwka D, Czany J, Grzybowski T, Wozniak M, Drewa G, Czechowicz W, Sir J: Analysis of microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer with the use of a well characterized multiplex system. *Acta Biochimica Polonica* 2003;50(4):1195-1203.
- Querzoli P**, Albonico G, di Iasio MG, Ferretti S, Rinaldi R, Cariello A, Pedriali M, Matteuzzi M, Maestri I, Nenci I: Biophenotypes and survival of BRCA1 and TP53 detected in breast cancer in young women. *Breast Cancer Res Treat* 2001;66:135-142.
- Rahko E**, Blanco G, Soini Y, Bloigu R, Jukkola A: A mutant TP53 gene status is associated with a poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients. *Eur J Cancer*. 2003 Mar;39(4):447-53.
- Regierer AC**, Possinger K: Mammakarzinom: Manual Diagnostik und Therapie. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 2005.
- Resnick MA**, Inga A, Functional mutants of the sequence-specific transcription factor p53 and implications for master genes of diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Aug 19;100(17):9934-9.
- Rhyu MS**: Molecular mechanisms underlying hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:240-251.

- Richard SM**, Bailliet G, Paez GL, Bianchi MS, Peltomaki P, Bianchi NO: Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60:4231-4237.
- Roche H**, Viens P, Biron P, Lotz JP, Asselain B; PEGASE Group, High-dose chemotherapy for breast cancer: the French PEGASE experience. *Cancer Control*. 2003 Jan-Feb;10(1):42-7.
- Rodenhuis S**, Bontenbal M, van Hoesel QG, Smit WM, Nooij MA, Voest EE, van der Wall E, Hupperets P, van Tinteren H, Peterse JL, van de Vijver MJ, de Vries EG; Netherlands Working Party on Autologous Transplantation in Solid Tumours: Efficacy of high-dose alkylating chemotherapy in HER2/neu-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2006 Apr;17(4):588-96.
- Rosen PP**. The pathological classification of human mammary carcinoma: past, present and future. *Ann Clin Lab Sci*. 1979 Mar-Apr;9(2):144-56.
- Rosenberg CL**, De Las M, Huang K, Cupples LA, Faller DV, Larson PS: Detection of monoclonal microsatellite alterations in atypical breast hyperplasia. *J Clin Invest* 1996; 98:1095-1100.
- Rosenberg CL**, Larson PS, Romo JD, De Las Morenas A, Faller DV: Microsatellite alterations indicating monoclonality in atypical hyperplasias associated with breast cancer. *Hum Pathol*. 1997 Feb;28(2):214-9.
- Rüschhoff J**, Dietmaier W, Luttges J, Seitz G, Bocker T, Zirngibl H, Schlegel J, Schackert HK, Jauch KW, Hofstädter F: Poorly differentiated colonic adenocarcinoma, medullary type: clinical, phenotypic, and molecular characteristics. *Am J Pathol* 1997; 150:1815-1825.
- Rüschhoff J**, Dietmaier W, Bocker T, Wallinger S, Kullmann F, Beham A, Hofstädter F: Molekulare Krebsdispositionsdiagnostik am Beispiel des kolorektalen Karzinoms. *Pathologe* 1998;19:269-278.
- Schaapveld M**, de Vries EGE, van der Graaf WTA, Otter R, de Vries J, Willemse PHB: The prognostic effect of the number of histologically examined axillary lymph nodes in breast cancer: stage migration or age association?. *A Surg Oncol* 2006;13(4):465-474.
- Scully R**, Puget N, Vlasakova K: DNA polymerase stalling, sister chromatid recombination and the BRCA genes. *Oncogene* 2000; 19:6176-6183.
- Shen KL**, Yang LS, Hsieh HF, Chen CJ, Yu JC, Tsai NM, Harn HJ: Microsatellite alterations on human chromosome 11 in situ and invasive breast cancer: a microdissection microsatellite analysis and correlation with p53, ER (estrogen receptor), and PR (progesterone receptor) protein immunoreactivity. *J Surg Oncol* 2000; 74:100-107.
- Shou J**, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, Schiff R: Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Jun 16;96(12):926-35.
- Siah SP**, Quinn DM, Bennett GD, Casey G, Flower RL, Suthers G, Rudzki Z: Microsatellite instability markers in breast cancer: a review and study showing MSI was not detected at 'BAT 25' and 'BAT 26' microsatellite markers in early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 60:135-142.
- Sidransky D**, Hollstein M: Clinical implications of the p53 gene. *Annu Rev Med* 1996; 47:285-301.
- Schmid P**, Schippinger W, Nitsch T, Huebner G, Heilmann V, Schultze W, Hausmaninger H, Wischnewsky M, Possinger K: Up-front tandem high-dose chemotherapy compared with standard chemotherapy with Doxorubicin and Paclitaxel in metastatic breast cancer: results of a randomized Trial. *J Clin Oncol* 2005;23(3):432-440.
- Schmitt FC**, Soares R, Gobbi H, Milanezzi F, Santos-Silva F, Cirnes L, Costa C, Seruca R: Microsatellite instability in medullary breast carcinomas. *Int J Cancer* 1999; 82:644-647.
- Schmoll HJ**, Höffken K, Possinger K: Kompendium Internistische Onkologie. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg NewYork 1999.
- Sobin LH**, TNM, sixth edition: new developments in general concepts and rules. *Semin Surg Oncol*. 2003;21(1):19-22.
- Somlo G**, Simpson JF, Frankel P, Chow W, Leong L, Margolin K, Morgan R Jr, Raschko J, Shibata S, Forman S, Kogut N, McNamara M, Molina A, Somlo E, Doroshow JH, Predictors of long-term outcome following high-dose chemotherapy in high-risk primary breast cancer. *Br J Cancer*. 2002 Jul 29;87(3):281-8.
- Sørlie T**, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74.
- Sotiriou C**, Piccart MJ, Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care? *Nat Rev Cancer*. 2007 Jul;7(7):545-53.
- Sourvinos G**, Kiaris H, Tsikkinis A, Vassilaros S, Spandidos DA: Microsatellite instability and loss of heterozygosity in primary breast tumours. *Tumour Biol* 1997; 18:157-166.
- Soussi T**, Beroud C: Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2001;1:233-240.
- Stadtmauer EA**, O'Neill A, Goldstein LJ, Crilley P, Mangan KF, Ingle JN, Lazarus HM, Erban J, Sickles C, Glick JH: Phase III randomized trial of high-dose chemotherapy (HDC) and stem cell support (SCT) shows no difference in overall survival or severe toxicity compared to maintenance chemotherapy with cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (CMF) for women with metastatic breast cancer who are responding to conventional induction chemotherapy: The 'Philadelphia' Intergroup Study (BPT-1). *Proc ASCO* 1999; 18:1a (#1).
- Stracker TH**, Theunissen JW, Morales M, Petrini JH: The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. *DNA Repair (Amst.)* 2004 Aug-Sept;3(8-9):845-54.
- Stratton RM**: Recent advances in understanding of genetic susceptibility to breast cancer. *Human Mol Genet* 1996;5:11515-1519.
- Stryer L**. *Biochemie*. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg/Berlin/Oxford 1996; S.127-139.
- Takahashi S**, Moriya T, Ishida T, Shibata H, Sasano H, Ohuchi N, Ishioka C, Prediction of breast cancer prognosis by gene expression profile of TP53 status. *Cancer Sci*. 2008 Feb;99(2):324-32.

- Takita K**, Sato T, Miyagi M, Watatani M, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi F, Abe R, Nakamura Y: Correlation of loss of alleles on the short arm of chromosomes 11 and 17 with metastasis of primary breast cancer to lymph nodes, *Cancer Res* 1992;52:3914-3917.
- Tartarone A**, Romano G, Galasso R, Iodice G, D'Arena G, Coccaro, Bochicchio A, Sgambato A, Di Renzo N: Should we continue to study high-dose chemotherapy in metastatic breast cancer patients? A critical review of published data. *Bone Marrow Transplantation* 2003;525-530.
- Teicher BA**, Frei E 3rd: Development of alkylating agent-resistant human tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1988;21(4):292-8.
- Teng SC**, Wu KJ, Tseng SF, Wong CW, Kao L. Importin KPNA2, NBS1, DNA repair and tumorigenesis. *J Mol Hist* 2006;37:293-299.
- Thakur S**, Zhang HB, Peng Y, Le H, Carroll B, Ward T, Yao J, Farid LM, Couch FJ, Wilson RB, Weber BL: Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 1997;17:444-452.
- Thangaraju M**, Kaufmann SH, Couch FJ: BRCA1 facilitates stress-induced apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines. *J Biol Chem* 2000;275(43):33487-33496.
- Thibodeau SN**, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260:816-819.
- Thibodeau SN**, French AJ, Roche PC, Cunningham JM, Tester DJ, Lindor NM, Moslein G, Baker SM, Liskay RM, Burgart LJ, Honchel R, Halling KC: Altered expression of hMLH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res* 1996;56:4836-4840.
- Thürlimann B**, Müller A, Senn HJ, Management of primary breast cancer: an update. *Onkologie.* 2004 Apr;27(2):175-9.
- Tischfield JA**: Loss of Heterozygosity: How I learned to stop worrying and love Mitotic Recombination. *Am J Hum Genet* 1997;61:995-999.
- Tokuda Y**, Tajima T, Narabayashi M, Takeyama K, Watanabe T, Fukutomi T, Chou T, Sano M, Igarashi T, Sasaki Y, Ogura M, Miura S, Okamoto S, Ogita M, Kasai M, Kobayashi T, Fukuda H, Takashima S, Tobinai K; Autologous Bone Marrow Transplantation Study Group; Breast Cancer Study Group of the Japan Clinical Oncology Group (JCOG). Phase III study to evaluate the use of high-dose chemotherapy as consolidation of treatment for high-risk postoperative breast cancer: Japan Clinical Oncology Group study, JCOG 9208. *Cancer Sci.* 2008 Jan;99(1):145-51.
- Tomiak E**, Piccart M, Mignolet F, Sahmoud T, Paridaens R, Nooy M, Beex L, Fentiman IS, Muller A, van der Schueren E, Rubens R: Characterisation of complete responders to combination chemotherapy for advanced breast cancer. A retrospective EORTC breast group study. *Europ J Cancer* 1996;32A:1876-1887.
- Tomita S**, Deguchi S, Miyaguni T, Muto Y, Tamamoto T, Toda T: Analyses of microsatellite instability and the transforming growth factor-beta receptor type II gene mutation in sporadic breast cancer and their correlation with clinicopathological features. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 53:33-39.
- Tormey DC**, Weinberg VE, Holland JF, et al.: A randomized trial of five and three drug chemotherapy and chemoimmunotherapy in women with operable node positive breast cancer. *J Clin Oncol* 1983;1:138-145.
- Toyama T**, Iwase H, Iwata H, Hara Y, Omoto Y, Suchi M, Kato T, Nakamura T, Kobayashi S: Microsatellite instability in situ and invasive sporadic breast cancers of Japanese Women. *Cancer Lett* 1996; 1088:205-209.
- Trujillo KM**, Yuan SS, Lee EY, Sung P: Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem.* 1998 Aug 21;273(34):21447-50.
- Tseng SF**, Chang CY, Wu KJ, Teng SC: Importin KPNA2 is required for proper nuclear localization and multiple functions of NBS1. *J Biol Chem.* 2005 Nov 25;280(47):39594-600.
- Tseng SL**, Yu IC, Yue CT, Chang SF, Chang TM, Wu CW, Shen CY: Allelic loss at BRCA1, BRCA2 and adjacent loci in relation to p53 abnormality in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;20:377-382.
- Valgardsdottir R**, Tryggvadottir L, Steinarsdottir M, Olafsdottir K, Jonasdottir S, Jonasson JG, Ogmundsdottir HM, Eyfjörd JE, Genomic instability and poor prognosis associated with abnormal TP53 in breast carcinomas. *Molecular and immunohistochemical analysis. APMIS.* 1997 Feb;105(2):121-30.
- van der Looij M**, Papp J, Sztán M, Pulay T, Elfadil I, Besznyak I, Tóth J, Devilee P, Oláh E: Allelic imbalance and microsatellite instability in BRCA1 associated breast and ovarian tumors. *Int J Oncol.* 2001 Apr;18(4):775-80.
- van 't Veer**, Dai H, van d, V, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415:530-536.
- Vaurs-Barriere C**, Vidal V, Penault-Llorca F, Kwiatkowski F, Maugard C, Bignon Y: Pathology of sporadic breast tumors with LOH at the BRCA1 locus: correlation with histopathological features specific to familial BRCA1 tumors and absence of microsatellite instability. *Int J Oncol* 1998; 12:1373-1378.
- Vaurs-Barriere C**, Penault-Llorca F, Laplace-Marieze V, Presneau N, Maugard CM, Fiche M, Hardouin A, Bignon YJ: Low frequency of microsatellite instability in BRCA1 mutated breast tumors. *J Med Genet* 2000;37:E32.
- Velculescu VE, El-Deiry WS**: Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Chem* 1996; 42:858-868.
- Verhoog LC**, Brekelmans CT, Seynaeve C, van den Bosch LM, Dahmen G, van Geel AN, Tilanus-Linthorst MM, Bartels CC, Wagner A, van den Ouweland A, Devilee P, Meijers-Heijboer EJ, Klijn JG: Survival and tumour characteristics of breast-cancer patients with germline mutations of BRCA1. *Lancet.* 1998 Jan 31;351(9099):316-21.
- Veronesi U**, Galimberti V, Zurrada S, Merson M, Greco M, Luini A: Prognostic significance of number and level of axillary node metastases in breast cancer. *Breast* 1993; 2:224-228.
- Vogelstein B**, Lane D, Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307-310.

- Vogelstein B**, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319:525-532.
- von Minckwitz, G**: Prävention des Mammakarzinoms. Fakten, Daten und Visionen. Uni-Med, Bremen, 2004.
- Wagner TM**, Möslinger RA, Muhr D, Langbauer G, Hirtenlehner K, Concin H, Doeller W, Haid A, Lang AH, Mayer P, Ropp E, Kubista E, Amirimani B, Helbich T, Becherer A, Scheiner O, Breiteneder H, Borg A, Devilee P, Oefner P, Zielinski C: BRCA1-related breast cancer in Austrian breast and ovarian cancer families: specific BRCA1 mutations and pathological characteristics. *Int J Cancer*. 1998 Jul 29;77(3):354-60.
- Wang ZC**, Lin M, Wei LJ, Li C, Miron A, Lodeiro G, Harris L, Ramaswamy S, Tanenbaum DM, Meyerson M, Iglehart JD, Richardson A: Loss of heterozygosity and its correlation with expression profiles in subclasses of invasive breast cancer. *Cancer Res* 2004;64,64-71.
- Weber JL**, May PE: Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44:388-396.
- Wild PJ**, Knüchel R, Dietmaier W, Hofstädter F, Hartmann A: Laser microdissection and microsatellite analyses of breast cancer reveal a high degree of tumor heterogeneity. *Pathobiology* 2000; 68:180-190.
- Wild PJ**: Genetische Veränderungen in fortgeschrittenen Mammakarzinomen nach Hochdosis-Chemotherapie und autologer Knochenmarkstransplantation als Indikator für Therapieansprechen und Überlebensrate. 2002.
- Wild PJ**, Reichle A, Andreesen R, Röckelein G, Dietmaier W, Rüschhoff J, Blaszyk H, Hofstädter F, Hartmann A: Microsatellite instability predicts poor short-term survival in patients with advanced breast cancer after high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *Clin Cancer Res*. 2004 Jan 15;10(2):556-64.
- Wild PJ**, Stoehr R, Knuechel R, Hartmann A, Dietmaier W : Laser microdissection for microsatellite analysis in colon and breast cancer. *Methods Mol Biol*. 2005;293:93-101.
- Winnepenninckx V**, Lazar V, Michiels S, Dessen P, Stas M, Alonso SR, Avril MF, Ortiz Romero PL, Robert T, Balacescu O, Eggermont AM, Lenoir G, Sarasin A, Tursz T, van den Oord JJ, Spatz A; Melanoma Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer: Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Apr 5;98(7):472-82.
- Winston JS**, Ramanaryanan J, Levine E: HER-2/neu evaluation in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 2004;121(Suppl 1):33-49.
- Woerner SM**, Kloor M, von Knebel Doeberitz M, Gebert JF: Microsatellite instability in the development of DNA mismatch repair deficient tumors. *Cancer Biomark*. 2006;2(1-2):69-86.
- Wooster R**, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G: Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378:789-792.
- Wooster R**, Cleton-Jansen AM, Collins N, Mangion J, Cornelis RS, Cooper CS, Gusterson BA, Ponder BA, von Deimling A, Wiestler OD: Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nat Genet* 1994; 6:152-156.
- Xu X**, Qiao W, Linke SP, Cao L, Li WM, Furth PA, Harris CC, Deng CX: Genetic interactions between tumor suppressors BRCA1 and p53 in apoptosis, cell cycle and tumorigenesis. *Nat Genet* 2001;28(3):266-271.
- Yamashita H**, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Zhang Z, Kobayashi S, Iwase H: Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2004;6(1):R24-30.
- Yamashita H**, Toyama T, Nishio M, Ando Y, Hamaguchi M, Zhang Z, Kobayashi S, Fujii Y, Iwase H: p53 protein accumulation predicts resistance to endocrine therapy and decreased post-relapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2006;8(4):R48.
- Yee CJ**, Roodi N, Verrier CS, Parl FF: Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Res* 1994; 54:1641-1644.
- Zander AR**, Schmoor C, Kröger N, Krüger W, Möbus V, Frickhofen N, Metzner B, Berdel WE, Koenigsmann M, Thiel E, Wandt H, Possinger K, Kreienberg R, Schumacher M, Jonat W, Randomized trial of high-dose adjuvant chemotherapy with autologous hematopoietic stem-cell support versus standard-dose chemotherapy in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes: overall survival after 6 years of follow-up. *Ann Oncol*. 2008 Jun;19(6):1082-9.
- Zannini L**, Lecis D, Lisanti S, Benetti R, Buscemi G, Schneider C, Delia D, Karyopherin-alpha2 protein interacts with Chk2 and contributes to its nuclear import. *J Biol Chem*. 2003 Oct 24;278(43):42346-51.
- Zekri AR**, Bahnassi AA, Bove B, Huang Y, Russo IH, Rogatko A, Shaarawy S, Shawki OA, Hamza MR, Omer S, Khaled HM, Russo J: Allelic instability as a predictor of survival in Egyptian breast cancer patients. *Int J Oncol* 1999; 15:757-767.
- Zielinski C** (Hrsg), Jakesz R, (Hrsg): Mammakarzinom (Onkologie Heute). Springer, Wien, 2007.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A	Adenin
Ag	Elementsymbol für Silber
AKMT	Autogene Knochenmarkstransplantation
APS	Ammoniumpersulfat
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ASZT	Autologe Stammzelltransplantation
BCNU	Carmustin
bp	Basenpaar(e)
BRCA1	breast cancer-1 gene
BRCA2	breast cancer-2 gene
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
CIS	Carcinoma in situ
CIN	Chromosomale Instabilität
CLIS	Carcinoma lobulare in situ
cm	Zentimeter
CRC	kolorektales Karzinom
CT	Chemotherapie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (Nukleotid)
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat (Nukleotid)
DDCT	Dosis- intensivierte Chemotherapie
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DFS	disease free survival
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (Nukleotid)
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat (Nukleotid)
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ebd.	eben diese(r)
EFS	Ereignisfreies Überleben
EGFR	Epidermal Growth Factor
ER	Östrogenrezeptor
et al.	et alteri (und andere)
evtl.	eventuell
FA	Fragmentanalyse
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
g	Gramm
G	Grad, histologischer
G	Guanin
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
ggf.	gegebenenfalls
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GTP Ran	9-β-D-Ribofuranosylguanin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure

HDCT	Hochdosis-Chemotherapie
HE	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
HER-2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (c-erbB2)
hMLH1	human MutL homolog 1
HNPCC	Hereditary non-polyposis colorectal cancer
HR	Hazard Ratio
HRBC	Hochrisiko-Brustkrebs
Hrsg	Herausgeber
i. e.	id est = d. h.
inc.	incorporated
iv.	intravenös
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaar(e)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
KMT	Knochenmarkstransplantation
konz.	konzentriert
l	Liter
LK	Lymphknoten
LOH	Loss of Heterozygosity
Lsg.	Lösung
M	molar
MA	Mikrosatelliten-Analyse
mA	Milliampere
Mb	Megabasen
MDM2	Murin double minute oncogene
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGP	magnetisch Glaspartikel
min	(n)
Mio.	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMR	Mismatch repair
MSH2	MutS homolog 2
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatelliten-stabil
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
n	Anzahl
NA	keine Angabe (not available)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NBS1	Nijmegen breakage syndrome
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
o. g.	oben genannt
Onc	Onkogen
OS	Overall survival (Gesamtüberleben)
OT	Objektträger
p	kurzer Chromosomenarm
p	Irrtumswahrscheinlichkeit (Statistik)

PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
PET	Paraffin embedded tissue
PFÜ	progreßfreies Überleben
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PH	proportional hazards
pmol	Pikomol
PR	Progesteronrezeptor
q	langer Chromosomenarm
rel.	relativ
RER	Replication error
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SKT	Schnellkochtopf
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannte
s. u.	siehe unten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethyl-Ethylendiamin
TM	Trademark
TNM	Tumorgröße, Lymphknotenbefall, Metastasen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TSG	Tumorsuppressorgen(e)
u	unit(s) (Aktivitätseinheit von Enzymen)
u.	und
u. a.	unter anderem
usw.	und so weiter
u./o.	und / oder
V	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
W	Watt
WAF1(p21)	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
weibl.	weiblich
WHO	World Health Organization
WSG	Westdeutsche Studiengruppe
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

7.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Arndt Hartmann, der mir dieses interessante Dissertationsthema überlassen hat. Ich danke ihm sehr für seine freundschaftliche und verlässliche Unterstützung sowie seinen steten Optimismus auch in schwierigen Situationen. Viel konnte ich von seiner Kompetenz und wissenschaftlichen Fähigkeit lernen.

Herrn Dr. Peter Wild danke ich für seine freundliche Betreuung und Unterstützung während den praktischen Arbeiten und der kritischen Beurteilung meiner Ergebnisse. Er war mir eine große Hilfe in sachlichen Fragen über das Thema hinaus, sein freundschaftlicher Zuspruch hat mir oft weitergeholfen.

Frau Prof. Dr. Nitz danke ich für die freundliche Bereitstellung der Proben und der erhobenen Datensätze sowie Herrn Oleg Gluz für die Unterstützung bei den statistischen Berechnungen.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. Wolfgang Dietmaier danken, der mit mir experimentelle Probleme und theoretische Grundlagen diskutierte, sowie Herrn Dr. Robert Stöhr für seine Erläuterungen zu den Materialien und Methoden. Weiterhin danke ich hier besonders für die Unterstützung durch die medizinisch- technischen Assistentinnen Monika Kerscher, Anne Pietryga-Krieger, Nina Nissl, Stefanie Meier und Kerstin Meier von denen ich sämtliche Methoden systematisch erlernen durfte und die maßgeblich an der experimentellen Durchführung beteiligt waren.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern, durch deren Unterstützung es möglich war, die für diesen langen Weg der Ausbildung erforderliche Kraft und Ausdauer aufzubringen. Meine Schwester Andrea stand mir immer mit Ratschlägen zu den theoretischen Fragen meiner Arbeit bei. Besonderer Dank gilt auch meiner Freundin Dominika für das eifrige Korrekturlesen und die organisatorische Unterstützung. In den letzten Zügen hat gerade sie mir die richtige Motivation zum Abschluss gegeben.

Jucundi acti labores.

(Angenehm sind die erledigten Arbeiten.)

(Cicero)

7.5 Originalarbeiten

Gluz O, Wild P, Meiler R, Diallo-Danebrock R, Ting E, Mohrmann S, Schuett G, Dahl E, Fuchs T, Herr A, Gaumann A, Frick M, Poremba C, Nitz UA, Hartmann A. Nuclear karyopherin alpha2 expression predicts poor survival in patients with advanced breast cancer irrespective of treatment intensity. *Int J Cancer*. 2008 Sep 15;123(6):1433-8.

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Dissertation allein und nur unter Zuhilfenahme der aufgeführten Hilfsmittel angefertigt wurde. Außerdem bestätige ich, dass diese Arbeit über vollständige Literaturangaben verfügt und bisher von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Weiden, den 06. April 2010

Robert P. Meiler